



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

جامعة الشهيد حمزة لخضر الوادي

Université Echahid Hamma Lakdhar- EL OUED

كلية العلوم الطبيعية والحياة

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

قسم البيولوجيا الخلوية والجزيئية

Département de Biologie Cellulaire et Moléculaire

MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

En vue de l'obtention du diplôme de Master Académique en Sciences biologiques

Spécialité : Toxicologie

THEME

Etude comparative sur l'effet antibactérien de différent parties de fruit orange algériens en utilisant la technique in vitro et in silico

Présenté Par :

- GOUBA Ferdous
- MEISSA Wiam
- BERCHAOUA Hana
- ZEHOU Cheima

Devant le jury composé de :

Présidente	MCB	Dr. GHANIA Ahmed	Université d'El Oued.
Examinatrice	MCB	Dr. ZEGHIB Khoulâ	Université d'El Oued.
Promoteur	MCB	Dr. LANEZ EL hafnaoui	Université d'El Oued.

- Année universitaire 2022 /2023-



Remerciement



*Nous tenons à remercier en premier lieu **ALLAH**, le tout Puissant de nous avoir donné courage, santé et patience pour*

*Nous tenons à remercier notre encadreur Dr, **Elhafnaoui Lanez**, docteur en **BIOLOGIE** -Université d'El Oued, pour son sérieux et ses efforts Afin de nous aider et de nous orienter ,Merci également pour votre disponibilité et votre gentillesse , Nous vous adressons notre profonde reconnaissance pour vos remarques et conseils en vue d'améliorer ce manuscrit.*

*Nous remercions **Pr.Touhami Lanez**, directeur du laboratoire de **VTRS**, d'université Echahide Hamma Lakhdar d'El Oued ; ainsi que **Mr Tlibaali** responsable du laboratoire .et L'ingénieur **ADAIKA Aicha***

Nous tenons à remercier sincèrement les membres de jury qui nous font le grand honneur d'évaluer ce travail.

*Nous exprimons nos sincères remerciements à la Faculté des sciences naturelles et biologiques - Université Al-EOUD , pour l'honneur qui nous a été décerné par le doyen de la faculté, **Zaatar**, et le chef du département, le **Dr Tlili**.*

Dédicace

Avec mes sentiments de gratitude les plus profonds, Je dédie ce modeste travail : À

La lumière de ma vie ; Mes parents

À l'homme de ma vie, À celui que j'aime beaucoup et qui m'a soutenue tout au

Long de ce projet : mon mari SALAH DEINE

À la flamme de mon cœur, la lumière de mes jours, Mes filles :

La source de mes efforts, celui que j'aime beaucoup et qui m'a soutenue tout au long

de ce projet ; ma sœur ASMA

À mes amies que j'ai vécu avec elles des beaux moments au

Cours de mon cursus à l'université :

HANA, CHAIMA, FERDOUS

Résumé

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable par leurs propriétés thérapeutiques. Dans le but de la valorisation de ces plantes, nous avons choisi l'orange utilisée depuis l'antiquité en médecine traditionnelle et explorée pour ses effets biologiques et pharmacologiques.

L'objectif de cette étude est déterminer l'activité biologique et de fournir des informations détaillées sur la structure de la naringine ainsi que son activité antibactérienne *in vitro* et ses interactions avec les protéines cibles *in silico*, par l'extraction de croûte d'orange (naringine), dont la composition chimique est : le nom de 5,7,4'-trihydroxyflavanone-7-O-néohespéridoside, qui est un glycoside flavonoïde alimentaire abondant d'agrumes.

L'extraction se fait par la méthode de macération. L'extrait a été préparé par le solvant méthanol le rendement d'extraction moyen pour la naringine est de 2% (poids sec), le pouvoir antimicrobien de l'extrait de naringine et leurs associations ont été évalués (*in vitro*), vis-à-vis de 2 souches microbiennes, par la méthode de diffusion des disques et des cylindres sur milieu solide.

Résultats de la CCM ont montré que la naringine présentait une RF de 0,7407 de naringine est confirmé l'HPLC de concentration de 60%. est confirmé par spectroscopie : infrarouge (IR), et UV-visible. L'activité antibactérienne de la naringine présentée par IC_{50} allant jusqu'à 27,75% mg/ml pour *E. coli* et 55,21% mg/ml, pour *S. aureus*. Les valeurs de ΔG (variation d'énergie libre) indiquent que la réaction est spontanée et que les interactions entre les composés et les protéines sont fortes ; les valeurs de ΔG sont les suivantes : Naringine- *E. coli* : 31,79 KJ.mol⁻¹ et naringine *S. aureus* : 26,42 KJ.mol⁻¹.

Afin Les résultats obtenus sont bons, ils donnent des bonnes activités biologiques, les deux résultats *in vitro* et *in silico* se complètent (l'un dépend de l'autre).

Mots clés : Naringine, antibactérien, Activité biologique, IC_{50} , *E. coli*, *S. aureus*.

Abstract

Medicinal plants are still the reliable source for their therapeutic properties.

In order to promote these plants, we have chosen the orange used since antiquity in traditional medicine and explored for its biological and pharmacological.

effects The objective of this study is to determine the biological activity and to provide detailed information on the structure of naringin as well as its antibacterial

activity in vitro and its interactions with target proteins in silico, by the extraction of orange rinds (naringin), whose chemical composition of: the name of 5,7,4'-trihydroxyflavanone-7-O-neohesperidoside, which is an abundant citrus dietary flavonoid glycoside.

L'extraction se fait par la méthode de macération. L'extrait a été préparé par le solvant méthanol le rendement d'extraction moyen pour la naringine est de 2% (poids sec), le pouvoir antimicrobien de l'extrait de naringine et leurs associations ont été évalués (in vitro), vis-à-vis de 2 souches microbiennes, par la méthode de diffusion des disques et des cylindres sur milieu solide.

CCM results showed that naringin exhibited that naringin exhibited an RF of 0.7407 naringin is confirmed HPLC of 60% concentration. is confirmed by spectroscopy: infrared (IR), and UV-visible. for *S. aureus*. The values of ΔG (variation of free energy) indicate that the reaction is spontaneous and that the interactions between the compounds and the proteins are strong; the values of ΔG are the following: Naringin-*E. coli*: 31.79 KJ.mol⁻¹ and naringin *S. aureus*: 26.42 KJ.mol⁻¹.

In order The results obtained are good, they give good biological activities, the two results in vitro and silico complement each other (one depends on the other).

Key words: *Naringin, antibacterial, biological activity, IC50, E.coli, S.aureus.*

ملخص

من أجل تعزيز هذه النباتات ، اخترنا البرتقال المستخدم منذ العصور القديمة في الطب التقليدي واستكشفنا آثاره البيولوجية و العلاجية الدوائية.

الهدف من هذه الدراسة هو تحديد النشاط البيولوجي وتقديم معلومات مفصلة عن تركيبة النارينجين وكذلك نشاطه المضاد للبكتيريا في المختبر وتفاعلاته مع البروتينات المستهدفة في السيليكون ، عن طريق استخراج قشور البرتقال (نارينجين) ، والتي يكون تركيبها الكيميائي: اسم 5,7,4'-trihydroxyflavanone-7- O -néohesperidoside ، وهو غليكوزيد فلافونويد غذائي وفير من الحمضيات.

يتم الاستخراج بطريقة النقع تم تحضير المستخلص بواسطة المذيب الميثانول ، وكان متوسط إنتاجية النارينجين 2٪ (وزن جاف) ، وتم تقييم القوة المضادة للميكروبات لمستخلص النارينجين وارتباطاتها في المختبر ، مقابل سلالتين ميكروبيتين عن طريق نشر الأقراص والأسطوانات على وسط صلب. أظهرت نتائج CCM أن النارينجين قدم RF تم تأكيد 0.7407 النارينجين من HPLC من تركيز 60 ٪. تم تأكيد عن طريق التنظير: الأشعة تحت الحمراء (IR) والأشعة فوق البنفسجية المرئية. يظهر النشاط المضاد للبكتيريا للنارينجين بواسطة IC50 بنسبة تصل إلى 27.75٪ مجم / مل لبكتريا قولونية و 55.21٪ ملغ / مل. لبكتريا المكورة العنقودية البرتقالية. تشير قيم ΔG (تباين الطاقة الحرة) إلى أن التفاعل تلقائي وأن التفاعلات بين المركبات والبروتينات قوية ؛ قيم ΔG كالتالي: نارينجين إي كولا ي: 31.79 كيلوجول مول⁻¹ ونارينجين العنقودية الذهبية: 26.42 كيلوجول مول⁻¹

من أجل النتائج التي تم الحصول عليها جيدة ، فإنها تعطي أنشطة بيولوجية جيدة ، كلاهما النتائج في المختبر والسيليكون تكمل بعضها البعض (أحدهما يعتمد على الآخر).

الكلمات المفتاحية: نارينجين ، مضاد للجراثيم ، نشاط بيولوجي ، IC50 ، الإشريكية القولونية ، المكورات العنقودية .

LISTES DES FIGURES ET **DES TABLEAUX**

Liste des figures

Figures	Titre	N° de Page
Figure 1	Image Illustration d'oranges	4
Figure 2	Schéma détaillant la structure du péricarpe de l'orange	5
Figure 3	Structure du phénol	6
Figure 4	Structure de base des flavonoïdes	7
Figure 5	Principales classes des flavonoïdes	8
Figure 6	Squelette de base des flavanones.	9
Figure 7	Structure de la Rutinose et neohesperidose	11
Figure 8	Structure de la naringine	12
Figure 9	Taille des bactéries	15
Figure 10	Structure de la cellule bactérienne	17
Figure 11	Structure du peptidoglycane	19
Figure 12	Ultrastructure de la paroi d'une bactérie à Gram positif	20
Figure 13	La structure d'un acide téichoïque. Un segment d'acide téichoïque comprenant des glycérols reliés par des molécules de phosphate. La chaîne R	20
Figure 14	Ultrastructure de la paroi d'une bactérie à Gram négatif	21
Figure 15	La structure de lipopolysaccharides	22
Figure 16	Formation de protoplastes et de sphéroplastes	26
Figure 17	Ultrastructure de la membrane plasmique	27
Figure 18	Structure des phospholipides membranaires.	27
Figure 19	Les différents types de transport à travers la membrane plasmique	29

Figure 20	Les trois systèmes de transport membranaire	30
Figure 21	Les trois classes de transporteurs membranaires.	30
Figure 22	Composition des ribosomes procaryotes vs ribosomes eucaryotes	32
Figure 23	Processus de biosynthèse des protéines par les ribosomes bactériens	33
Figure 24	Le changement de conformation de l'ADN bactérien	34
Figure 25	La structure en double hélice de l'ADN	35
Figure 26	Le mode semi-conservatif de la réplication d'ADN	36
Figure 27	Rôle de l'ADN dans l'expression des caractères héréditaires	36
Figure 28	Modes de transfert plasmidique (conjugaison, transduction et transformation)	38
Figure 29	Le transposon de la résistance à la vancomycine chez le genre <i>Enterococcus</i>	39
Figure 30	L'ultrastructure d'un flagelle de bactéries à Gram négatif (à gauche) et à Gram positif (à droite)	43
Figure 31	Résultats d'une coloration de Benito-Trujillo effectuée sur <i>Bacillus subtilis</i> . 1: corps bacillaire, 2 : endospore sub-terminale, 3: spore mature libre en d'hors du corps bactérien	45
Figure 32	Les différentes morphologies de l'endospore bactérienne	46
Figure 33	La structure d'une endospore bactérienne	46
Figure 34	Le cycle sporal; passage de la forme végétative à la forme sporale et vice-versa	47
Figure 35	La germination d'une endospore	49
Figure 36	Principaux mécanismes d'action des antibiotiques	51
Figure 37	Détermination de la CMI par dilution en milieu liquide	58

Figure 38	orange	60
Figure 39	Les croûtes d'orange pendant le séchage	60
Figure 40	Poudre de croûte se	60
Figure 41	Montage d'évaporation a pression réduit	61
Figure 42	Montage de chauffage	61
Figure 43	Montage de cristallisation utilisation de l' ampoule à décanter	62
Figure 44	Structure de naringine optimisé avec B3LYP/6-311++G(d,p)	67
Figure 45	Structure de : Amoxicilline extraites de la base de données DrugBank	67
Figure 46	Chromatographie sur couche mince (CCM) du naringine	70
Figure 47	Chromatogramme de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) du naringine	71
Figure 48	Caractérisation du naringine extrait (Linge noire) et naringine référence (Linge rouge) par spectroscopie infrarouge (IR)	72
Figure 49	Spectre UV du naringine extrait (Linge noire) et de naringine référence (Linge rouge)	73
Figure 50	Les photographies des zones d'inhibition obtenues pour les tests d'activité antibactérienne	74
Figure 51	Les courbes de régression linéaire de pourcentage d'inhibition des bactéries en fonction de la concentration de Naringine et Amoxicilline	76
Figure 52	Tracés des courbes de $A/(A_0 - A)$ en fonction de $1/[Naringine]$ et $1/[Amoxicilline]$ utilisées pour calculer les constantes de liaison	78
Figure 53	Présentation 2D et 3D du ligand naringine avec l'E. coli	83
Figure 54	Présentation 2D et 3D du ligand amoxicilline avec l'E. coli	83
Figure 55	Présentation 2D et 3D du ligand naringine avec le S. aureus	83
Figure 56	Présentation 2D et 3D du ligand amoxicilline avec le S. aureus	84

Liste des tableaux

Tableaux	Titre	N° de Page
Tableau 1	Principales flavanones aglycones	10
Tableau 2	Principales flavanones-O-glycoside	10
Tableau 3	Quelques types morphologiques fréquemment retrouvés chez les bactéries.	16
Tableau 4	Illustration des étapes de la coloration de GRAM	24
Tableau 5	Arrangement des flagelles chez les bactéries	43
Tableau 6	Les informations relatives aux récepteurs cibles sélectionnées pour les études d'amarrage moléculaire.	68
Tableau 7	Les paramètres de docking sélectionnés pour les récepteurs cible.	69
Tableau 8	Diamètre des zones d'inhibition de naringine et d'amoxicilline contre E. coli et S. aure	74
Tableau 9	Valeurs des absorbances tirées à partir du test antibactérien	75
Tableau 10	Activité antibactérien de naringine et amoxicilline par le test d'inhibition de E. coli et S. aureus	77
Tableau 11	Constantes de liaison et énergies libres de liaison pour Naringine et Amoxicilline avec les deux types des bactéries calculées à partir des données UV-Vis.	79
Tableau 12	Les paramètres de liaison obtenu par amarrage moléculaire de naringine et amoxicilline avec l'E. coli et le S. aureus cyclooxygénase-2	81

Tableau 13	Comparaison des paramètres de liaison et d'IC50 pour les activités biologiques obtenu par UV et amarrage moléculaire	84
-------------------	--	----



Liste des abréviations

- **E.coli** : Escherichia coli.
- **S.aureus** : Staphylococcus aureus.
- **AMC** : Amoxicilline.
- **ATCC** : American Type Culture Collection.
- **CMI** : Concentration minimal inhibitrice.
- **MH** : Muller Hinton.
- **IC50** : Concentration Inhibitrice 50.
- **D.O** : Densité optique.
- **%** : Pourcentage.
- **IR** : Spectroscopie infrarouge.
- **UV** : Spectrophotométrie UV-Visible.
- **C.C.M** : Chromatographie sur couche mince.
- **HPLC** : Chromatographie liquide à haute performance.
- **ANT** : Antibiotique.

Sommaire

Dédicace

Résumé

Abstract

Liste des abréviations

Introduction générale 1

PARTIE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1 : GENERALITES SUR LA NARINGINE

I.1. Orange Citrus.....	3
I.1. 1.Généralité sur les agrume	3
I.1.2. Origine et histoire les agrumes	3
I.1.3. L'ORANGE.....	4
I.1.4. La croûte d'orange.....	4
I.1.5. Composition chimique des croûtes d'orange	5
I.1.6. Composés phénoliques	6
I.1.6.1. Les flavonoïdes.....	7
I.2. Classification	8
I.3. Description générale de la classe des flavanones	9
I.3.1 . Chimie et classification des flavanones.....	9
I.3.2. Définitions et Chimie de la naringine.....	11
I.3.3. Sources de la naringine.....	12
I.3.4.Toxicité de la naringine	13
I.5. Réactivité et activité biologique de la naringine	13
I.5.1. Antibactérienne.....	13

CHAPITRE 2 : ANTIBACTERIEN

II.1. Définition les bactéries.....	14
II.2. La morphologie cellulaire	14
II.2.1.Taille des bactéries	14
II.2.2.La forme et associations cellulaires	15
II.3. Structure et anatomie de la cellule bactérienne.....	17
II.3.1. Paroi bactérienne	18
II.3.1.1. Composition chimique	18
II.3.1.2. Structure du peptidoglycane.....	18

II.3.1.2.1. Parois des bactéries à Gram positif	19_Toc137496046
II.3.1.2.2. Les parois des bactéries à Gram négatif.....	21
II.3.1.3. Coloration de Gram	23
II .3 .1. 4. Cas de parois particulières.....	24
II .3 .1. 5. Fonctions	25
II.3.2. Membrane plasmique	26
II.3.2.1. Structure et composition chimique.....	26
II .3 .2.2. Fonctions	29
II .3 .3. Le cytoplasme	31
II .3 .3.1. Les ribosomes.....	31
II .3.3.2. Les corps d'inclusion et les substances de réserve	33
II .3 .3.3. Le chromosome	34
II .3 .4. Les plasmides	37
II .3.6. La capsule.....	40
II .3 .7. Les cils et les flagelles.....	42
II .3 .8. Les endospores bactériennes	44
II .4. Mode d'action des antibiotiques	50
II .4.1. Les antibiotiques agissant sur la paroi bactérienne	50
II .4.2 . Les antibiotiques inhibant la synthèse protéique.....	50
II .4.3. Les antibiotiques inhibant la synthèse ou le fonctionnement des acides nucléiques	50
II .4.4. Les antibiotiques agissant sur le métabolisme intermédiaire	51
II .5. Principaux mécanismes de la résistance bactérienne aux antibiotiques.....	51
II .5.1. Définition de la résistance	51
II .5.1.1. La résistance naturelle.....	51
II .5.1.2. La résistance acquise	52
II .5.1.3. La résistance croisée.....	52
II .5.1.4. La modification de la cible :	53
II .6. Les Infections bactériennes	54
II .6. 1. Classification des agents pathogènes	55
II .6. 1. 1 . Agents pathogènes primaires	55
II .6. 1. 2 . Agents pathogènes opportunistes	55
II .7. Toxicogénèse	56
II .7.1. Les toxines A-B :	56

II .7.2.Les toxines formant des pores	56
II .7.3 .Les enzymes hydrolytiques	56
II .8. L'antibiogramme	57
II .8.1. Définition	57
II .8.2. Le but de l'antibiogramme	57
II .8.3.Principe.....	57
II .8.4. Les techniques d'antibiogramme	57
II .9. Concentration minimale inhibitrice (CMI)	58
II .9.1.La bactérie est sensible.....	58
II .9.2. La bactérie est résistante	58
II .9.3La bactérie est intermédiaire	58

PARTIE II : SYNTHESE EXPERIMENTALE

CHAPITRE 1 : MATERIEL ET METHODES

I .1 . Matériel.....	59
I .1.1. Matériel végétal	59
I .1.2. Réactifs utilisés.....	59
I .1.3.Matériels de laboratoire.....	59
I .1.4. <i>Produits chimiques</i>	60
I .2.méthodes.....	60
I .2.1.Extraction de Naringine.....	60
I .2.2. Rendement d'extraction.....	62
I .2.3. Caractérisation du Naringine	62
I .2.3.1. Caractérisation par Infrarouge (IR)	63
I .2.3.2. Caractérisation par spectroscopie UV-Visible	63
I .2.3.3 Caractérisation par Chromatographie sur couche mince (C.C.M)	64
I .2.3.4. Caractérisation par La chromatographie liquide à haute performance (HPLC)	65
I .2.4. Méthodes d'évaluation In Vitro des activités biologiques	65
I .2.4.1.Evaluation in vitro de l'activité antibactérienne.....	65
I .2.5. Méthodes d'évaluation In Silico des activités biologiques	66
I .2.5.1. Évaluation de l'activité biologique par amarrage moléculaire	66
I .2.5.1.1. Préparation des ligands.....	66
I .2.5.1.2. Préparation des récepteurs	67
I .1.5.1.3. Expériences d'amarrage Moléculaire	69

CHAPITRE 2 : RESULTATS ET DISCUSSION

II.1. Caractérisation.....	70
II.1.1. Caractérisation par Chromatographie sur couche mince (C.C.M)	70
II.1.2. Caractérisation par La chromatographie liquide à haute performance (HPLC).....	71
II.1.3. Caractérisation par Infrarouge (IR)	71
II.1.4. Caractérisation par spectroscopie UV-Visible	72
II.2. Évaluation In Vitro des activités biologiques	73
II.2.1. Évaluation de l'activité antibactérien	73
II.2.1.1. Détermination du diamètre de la zone d'inhibition.....	73
II.2.1.2. Activités inhibitrice des bactéries (IC50).....	75
II.2.1.3. Constantes de liaison	78
II.2.1.4. Énergie libre de liaison.....	79
II.3. Évaluation In Silico des activités biologiques.....	80
II.3.1. Évaluation de l'activité biologique par amarrage moléculaire.....	80
II.3.1.1. Évaluation de l'activité antibactérien	80
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	70
Conclusion	86
Perspectives.....	88
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	87
ANNEXES	97

INTRODUCTION GENERALE



Introduction générale

Pendant des milliers d'années, les civilisations du monde entier ont utilisé des plantes médicinales pour traiter une variété de maladies. La plus ancienne preuve écrite de l'utilisation de plantes médicinales a été trouvée sur une plaque d'argile sumérienne, d'environ 5000 ans (**Petrovska et al, 2012**).

De nos jours, les plantes médicinales traditionnelles continuent d'être la principale source de soins de santé dans de nombreux pays en développement et régions rurales. Les études ethnobotaniques se sont révélées très utiles pour identifier les plantes bioactives, et de plusieurs recherches ont été Menées sur les activités et la composition chimique des plantes ethnomédicinales (**Reverter et al., 2017**).

Les plantes médicinales et les médicaments dérivés des plantes sont largement utilisés dans les cultures traditionnelles du monde entier et ils deviennent de plus en plus populaires dans la société moderne comme alternatives naturelles ou compléments aux produits chimiques de synthèse.

Les produits naturels et leurs dérivés (y compris les antibiotiques) représentent plus de 50% de tous les médicaments à usage clinique dans le monde. Les plantes supérieures contribuent à pas moins de 25% au total (**Van Wyk et Wink et al, 2018**).

Le lien entre les plantes médicinales, l'homme et les médicaments dérivés des plantes médicinales, décrit le passé de l'humanité. Les plantes médicinales constituent la base généreuse des médicaments naturels (**Omar et al., 2019**).

De nos jours, dans de nombreux pays du monde, les plantes aromatiques et médicinales ont reçu une attention croissante (**Al-Tawaha et al., 2014**). En Algérie, de nombreux chercheurs ont étudié et explorer les constituants bioactifs de leur métabolisme secondaire, pour autoriser leur utilisation prolongée en médecine populaire (**Bouzouina et al., 2016**). Avec plus de 3139 espèces (**Quézel et Santa et al, 1963**), la flore algérienne est l'une des plus riches d'Afrique du Nord. Parallèlement à sa richesse en biodiversité, l'Algérie a une riche tradition médicale à base de plantes (**Miara et al., 2018**). Parmi cette végétation, on trouve un grand nombre de plantes aromatiques et médicinales y pousse spontanément qui constituent une source de substances ayant des vertus thérapeutiques diverses, utilisées depuis l'Antiquité dans la pharmacopée traditionnelle et pour l'aromatisation des aliments.

Le stress oxydant est impliqué dans de très nombreuses maladies comme facteur déclenchant ou associé à des complications, la plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes augmente la multiplication mitochondriale de radicaux (**GIRODON et al., 2010**). Parmi les activités biologiques des plantes médicinales, ces dernières années l'attention s'est portée sur l'activité antioxydante en raison du rôle qu'elle joue dans la prévention des maladies chroniques telles que les pathologies du cœur, le

cancer, le diabète, l'hypertension, et la maladie d'Alzheimer en combattant le stress oxydant (**MEDDOUR et al., 2013**). Aussi la maîtrise des infections bactériennes devient complexe du fait que de nombreuses bactéries ont développé une résistance à la plupart des antibiotiques ce qui a constitué un problème de santé important à l'échelle mondiale (**BENBRINIS et al, 2012**).

Les végétaux furent de plus en plus utilisés pour l'extraction des substances physiologiquement actives ou pouvant être transformées en médicament. Mais avec l'introduction de la chimiothérapie, l'usage des plantes médicinales a connu un certain recul. Cependant l'emploi abusif et souvent incontrôlé de cette chimiothérapie en particulier l'antibiothérapie a fait apparaître un phénomène de résistance chez la plupart des agents bactériens. Face à ce problème de résistance, l'utilisation de la phytothérapie est de plus en plus d'actualité. La recherche de nouvelles molécules possédant un pouvoir antibactérien est également très active, notamment au niveau des plantes de la pharmacopée africaine (**ATEFBEIBU et al, 2002**)

L'évaluation des propriétés phytopharmaceutiques, antioxydante et antimicrobienne demeure une tâche très intéressante et utile, en particulier pour les plantes d'une utilisation rare ou moins fréquente ou non connue dans la médecine traditionnelle. Ces plantes représentent une nouvelle source de composés actifs (**TEIXEIRA DA SILVA et al, 2004**).

Différentes plantes aromatiques sont caractérisées par la biosynthèse des molécules odorantes et volatiles qui consistent à ce qu'on appelle les huiles essentielles (**B. Reguig et al ,2017**) ces huiles sont utilisées comme une source de molécules bioactifs d'origine naturels jouissantes d'activités biologiques notamment l'activité antimicrobienne, anti oxydantes, antiseptiques et anti-inflammatoires (**G.m.bilal et al ; 2015**)

L'objectif de notre travail vise en particulier à étudier l'effet antibactérien, ainsi que d'évaluer les activités antibactérienne des composés bioactifs de ces plantes écorce d'orange « *Citrus*», extraits par usage des solvants à différents polarités (methanol, et l'eau) Plusieurs méthodes microbiologiques et approches techniques ont été utilisées lors de cette étude.

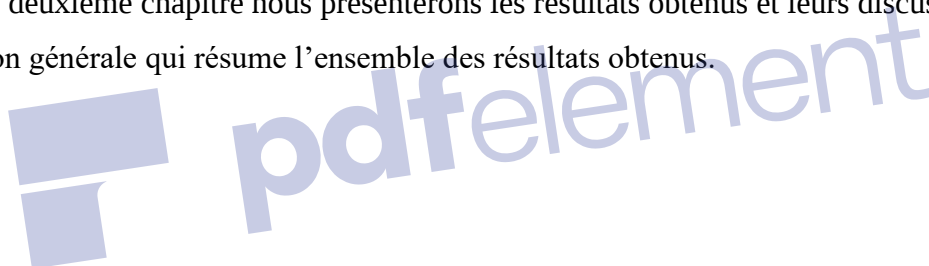
Notre travail a été divisé en deux parties ; nous aborderons dans une première partie une étude bibliographique qui regroupe deux chapitres dont le premier concerne une description détaillée de plante étudiée et nous présenterons succinctement une description sur le molécule naringine (structure et propriétés physico-chimiques). Le deuxième chapitre est consacré aux des caractères généraux de bactéries d'importance clinique, et les antibiorésistances.

La deuxième partie est réservée à l'étude expérimentale subdivisée en deux chapitres : le premier décrit le matériel et les méthodes utilisées dans ce travail qui porte sur :

L'étude phytochimiques de la plante sélectionnée;

L'étude in vitro et in silico des activités biologiques antibactérienne d' extrait de la plante (naringine) vis-à-vis deux souche microbienne (E.coli ,S.aureus)par la méthode de diffusion des disques et des cylindres sur milieu solide.

Dans le deuxième chapitre nous présenterons les résultats obtenus et leurs discussions. Enfin une conclusion générale qui résume l'ensemble des résultats obtenus.



PARTIE I

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1

GENERALITES SUR LA NARINGINE



I.1. Orange Citrus :

I.1. 1.Généralité sur les agrume :

Les agrumes possèdent de nombreuses vertus, leur teneur élevée en vitamines, leur faible apport calorique et leur potentiel antioxydant font de ces fruits un aliment très demandé au niveau mondial (**ALIOUANE Fatiha et al, 2015**).

Les agrumes sont des petits arbres ou arbustes, dont la taille peut varier de 2 à 10 mètres de haut suivant les espèces. Leur frondaison est généralement dense et leurs feuilles sont persistantes, à l'exception des *Poncirus*. Leurs fruits et toutes les parties de l'arbre (écorce, feuilles, branches, et fleurs) contiennent des glandes à essence (**Tigrine et al ;2016**).

La peau du fruit est une écorce (péricarpe) composée de deux couches concentriques. La couche superficielle, rugueuse et résistante, de couleur vive souvent jaune orange sous l'action des flavonoïdes, est nommée épicarpe ou flavedo ou encore zeste en terme culinaire. La couche interne, blanche et spongieuse, est le mésocarpe ou albédo (**Tigrine et al ;2016**).

La pulpe est composée de quartiers juteux contenant les pépins. Elle est riche en vitamine C. Ce sont des fruits non-climactériques qui doivent être récoltés à maturité. Ils sont résistants au transport et à la conservation. Si les fruits sont assez aisés à différencier sur le plan culinaire, la distinction des espèces botaniques est en revanche complexe, car les différentes espèces s'hybrident très facilement et sont difficiles à fixer. Le genre *Citrus* ne contiendrait finalement pas plus de onze espèces (**Bénédict et Michel,et al ; 2011**).

Les agrumes appartiennent à la famille des Rutacées, qui comprend de nombreuses espèces (environ 16000), pour la plupart ligneuses, l'une des caractéristiques de cette famille est la présence dans les fruits de glandes oléifères contenant des essences fortement aromatiques (**Colombo et al, 2004**).

Les citrus comprennent six espèces orange, mandarines, limettes, pamplemousses, citrons, et kumquats et chaque espèce comporte de nombreuses variétés. De plus, par croisement sont nés de nombreux hybrides, tels que les clémentines, ou les limes (citrons doux)(**Espiard et al, 2002**).

I .1.2. Origine et histoire les agrumes :

« Citrus », plus communément appelés agrumes, sont originaires d'Asie. Ils ont été introduits dans le bassin méditerranéen par Alexandre le Grand. C'est pour cela qu'on les désigne également sous le nom d'Hespéridé qui provient du grec *Esperos* « le jardin où se trouvaient les fruits succulents ». Plus tard, les agrumes ont été introduits sur la côte et dans l'Afrique par des échanges commerciaux qu'assuraient les califes arabo-musulmans. Leur entrée, en Amérique, s'est faite par les européens (**Ferhat et al 2001**)

I .1.3. L'ORANGE :

L'orange est l'un des agrumes le plus répandu au monde et le plus connu. C'est le quatrième fruit le plus cultivé au monde (**Escartin et al, 2008**).

C'est un fruit juteux, sucré, excitant et très riche en vitamine C ; le plus Comestible, on l'utilise pour les salades de fruits, les confitures, ou pour consommer son jus (**Bousbia et al, 2011**). Donnent à la pulpe sa couleur plus ou moins marquée jaune orange pour les Flavonoïdes et les caroténoïdes, jaune pour les xanthophylles, rouge ou rou violace pour les anthocyanes



Figure 1 : Image Illustration d'oranges.

I .1.4. La croûte d'orange :

La peau du fruit est une écorce (péricarpe) composée de deux couches concentriques. La couche superficielle, rugueuse et résistante, de couleur vive souvent jaune orange sous l'action des flavonoïdes, est nommée épicarpe ou flavedo ou encore zeste en cuisine. La couche interne, blanchet spongieuse, est le mésocarpe ou albédo. La pulpe est composée de quartiers juteux contenant les pépins. Elle est riche en vitamine (C). Ce sont des fruits non-climactériques qui doivent être récoltés à maturité. Ils sont résistants au transport et à la conservation. Si les fruits sont assez aisés à différencier sur le plan culinaire, la distinction des espèces botaniques est en revanche complexes, car les différentes espèces s'hybrident très facilement et sont difficiles à fixer. Le genre Citrus ne contiendrait finalement pas plus de onze espèces (**Bénédict et Michel et al, 2011**).

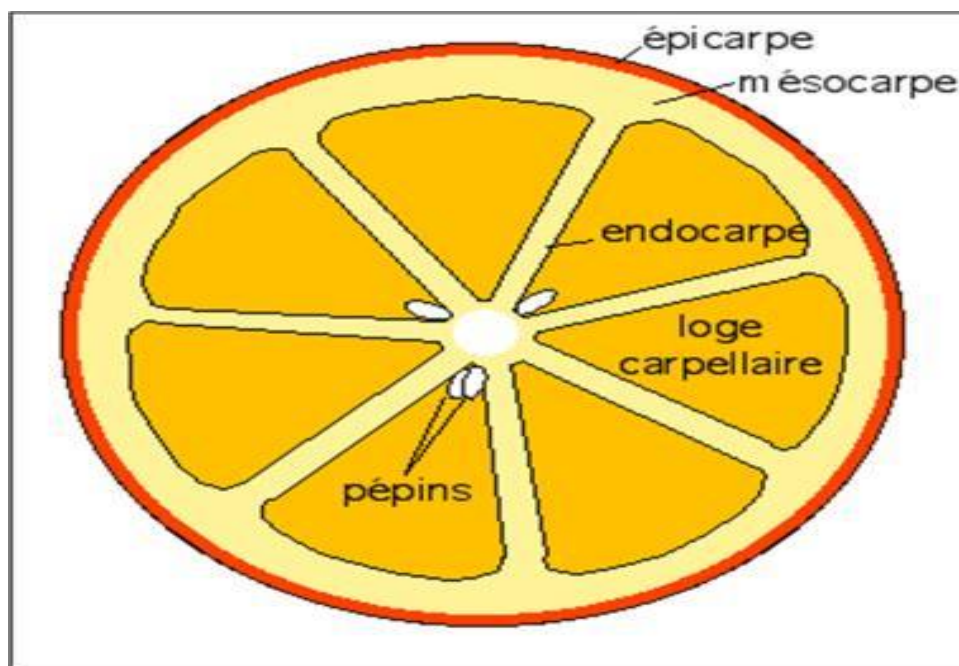


Figure 2: Schéma détaillant la structure du péricarpe de l'orange.

I .1 .5. Composition chimique des croûtes d'orange :

La composition chimique des croûtes d'agrumes est sujette à des variations sous l'influence de divers facteurs et notamment la variété. De plus, dans une même variété, la teneur en divers composés dépend des facteurs climatiques et environnementaux (**Hamidi et Limam et al ;2018**).

Les croûtes d'orange présentent des teneurs élevées en eau (variant de 2,97-3,79 g/g bs), soit 60% à 75% en base humide) et en sucres solubles (6,52-47,81 g/100g bs). De ce fait, c'est un coproduit hautement périssable qui fermente et présente un développement des moisissures (**Ferhat et al., 2011 ; Kammoun et al., 2011**). De plus, ce coproduit est riche en protéines (1,799,06 g/100g bs) et en minéraux (2,52-10,03 g/100 bs) alors que les lipides sont très peu abondants (de 0,48 jusqu'à 4 g/100g bs) (**Hamidi et Limam et al ;2018**).

Les croûtes sont particulièrement riches en composés digestibles et offrent de nombreuses possibilités d'utilisation pour l'alimentation fonctionnelle humaine et animale ainsi qu'en tant que complément alimentaire (**Bampidis & Robinson et al, 2006**). L'utilisation des croûtes fraîches en alimentation pour bétail est limitée à cause des maladies que peut provoquer la consommation de ce produit (mycotoxicose, para kératose du rumen) (**Duoss-Jennings et al.,2013**).

Les croûtes d'agrumes sont une source importante d'essences odorantes et d'huiles essentielles de 0,6 à 1% (**Oreopoulou et al., 2007 ; Yeoh et al., 2008 ; Hosni et al., 2010 ; Farhat et al., 2011**). Les croûtes contiennent aussi des pigments, essentiellement des caroténoïdes (0,01-0,20g/100g bs)

mais aussi des anthocyanes (dans le cas des oranges Sanguines) (**Hamidi et Limam et al ;2018**).

D'autre part, plusieurs études montrent que les croûtes d'agrumes contiennent aussi des composés biologiquement actifs comme la vitamine C (0,109-1,150 g/100g bs) (**Goulas et al.,2012 ; Barros et al., 2012**) et les fibres alimentaires (6,30-82,69 g/100g bs) (**Ghasemi et al.,2009 ; Magda et al., 2008**).

Les croûtes d'agrumes sont aussi riches en composés phénoliques (0,67-22,32 g/100g bs) (**Hamidi et Limam et al ; 2018**).

I .1.6. Composés phénoliques :

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires synthétisés par les végétaux, non essentiels à la survie de la plante. Au niveau végétal, les composés phénoliques sont un moyen de défense contre le rayonnement U.V, les agressions par les pathogènes et ils contribuent à la pigmentation des plantes (**Manach et al., 2004 ; Ignat et al., 2011**). Ils sont caractérisés par la présence d'un cycle aromatique et d'un ou plusieurs groupements phénoliques dans leur structure (**Figure3**) et se différencient par le nombre et l'enchaînement des noyaux aromatiques, le nombre et la position des groupes hydroxyles ainsi que la présence de divers substituant (groupes alkyles, glycosyles, acides organiques...) (**Macheix et al., 2006; Hollman et al., 2010**).

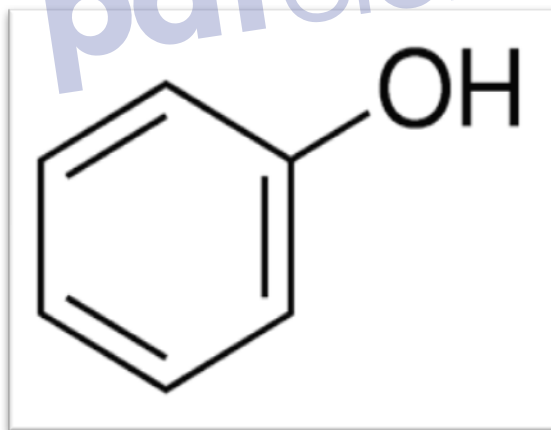


Figure 3 : Structure du phénol (Macheix et al., 2006).

Les oranges sont une très bonne source de composés phénoliques (**Balasundram et al.2006**). Ces derniers se trouvent en grande proportion dans l'écorce (plus de 15% que la pulpe) (**Gorinstein et al, 2001 ; Goulaset Manganaris, 2012**).

On retrouve principalement deux classes de composés phénoliques dans les croûtes d'orange : les flavonoïdes et les acides phénoliques.

I .1.6.1. Les flavonoïdes :

Les flavonoïdes représentent une classe de métabolites secondaires largement répandus dans le règne végétal. Ce sont des composés phénoliques de faible poids moléculaire possédant un squelette carboné en C6-C3-C6. Ils sont constitués d'un squelette à 15 atomes de carbone (**Figure 4**) formant 2 noyaux aromatiques (A et B) et un hétérocycle (C) à oxygène dont la nature définit l'appartenance du flavonoïde à un groupe déterminé (**Erdman et al., 2007 ; Ignatet al., 2011**). Les principaux groupes de flavonoïdes présents dans les croûtes d'agrumes sont les flavanones, les flavones et les flavonols. Chaque groupe comprend lui-même de nombreux composés qui diffèrent selon le degré d'hydroxylation et de glycosylation.

Les flavonoïdes individuels majoritaires des croûtes de l'orange Maltaise sont : La Néo hespéridine et l'hespéridine qui représentent à eux seuls 87,69% des flavonoïdes totaux.

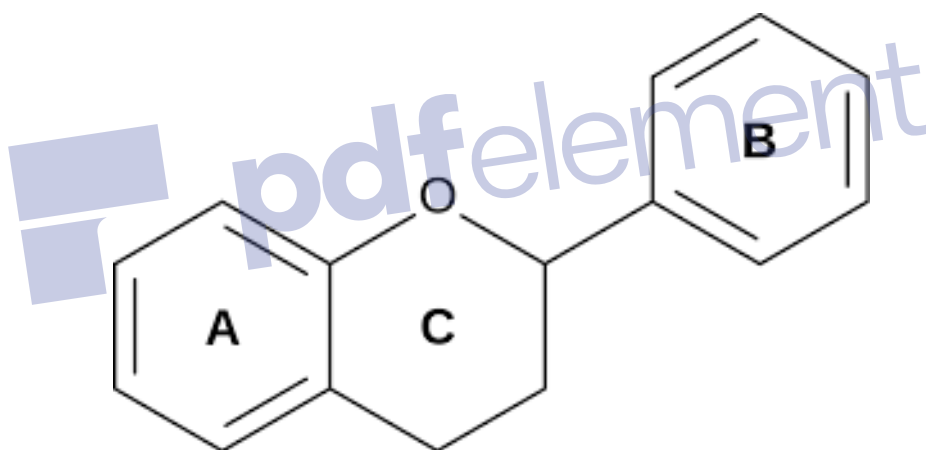


Figure 4 : Structure de base des flavonoïdes (**Erdman et al., 2007**).

Les flavanones sont rarement présents dans les fruits exceptés dans les agrumes où on les retrouve en grande quantité, concentrées dans les croûtes (**Tomas Barberan et Clifford et al, 2000**). Les flavanones les plus abondantes dans les croûtes sont **la naringine, / l'hespéridine**.

I.2. Classification :

Les flavonoïdes se divisent en plusieurs sous-classes qui se distinguent par une diversité fonctionnelle au niveau des positions 2, 3 et 4 du cycle C[4-5-6]. Les principales classes des flavonoïdes sont : les flavanones, les flavanonols, les flavones, les flavonols, les flavanes, flavan-3,4-diol, les catéchines, les anthocyanidines, les chalcones, les dihydrochalcone et les iso-flavonoïdes (figure5) (Pauly G, Ghoul M et al ; 2004) .

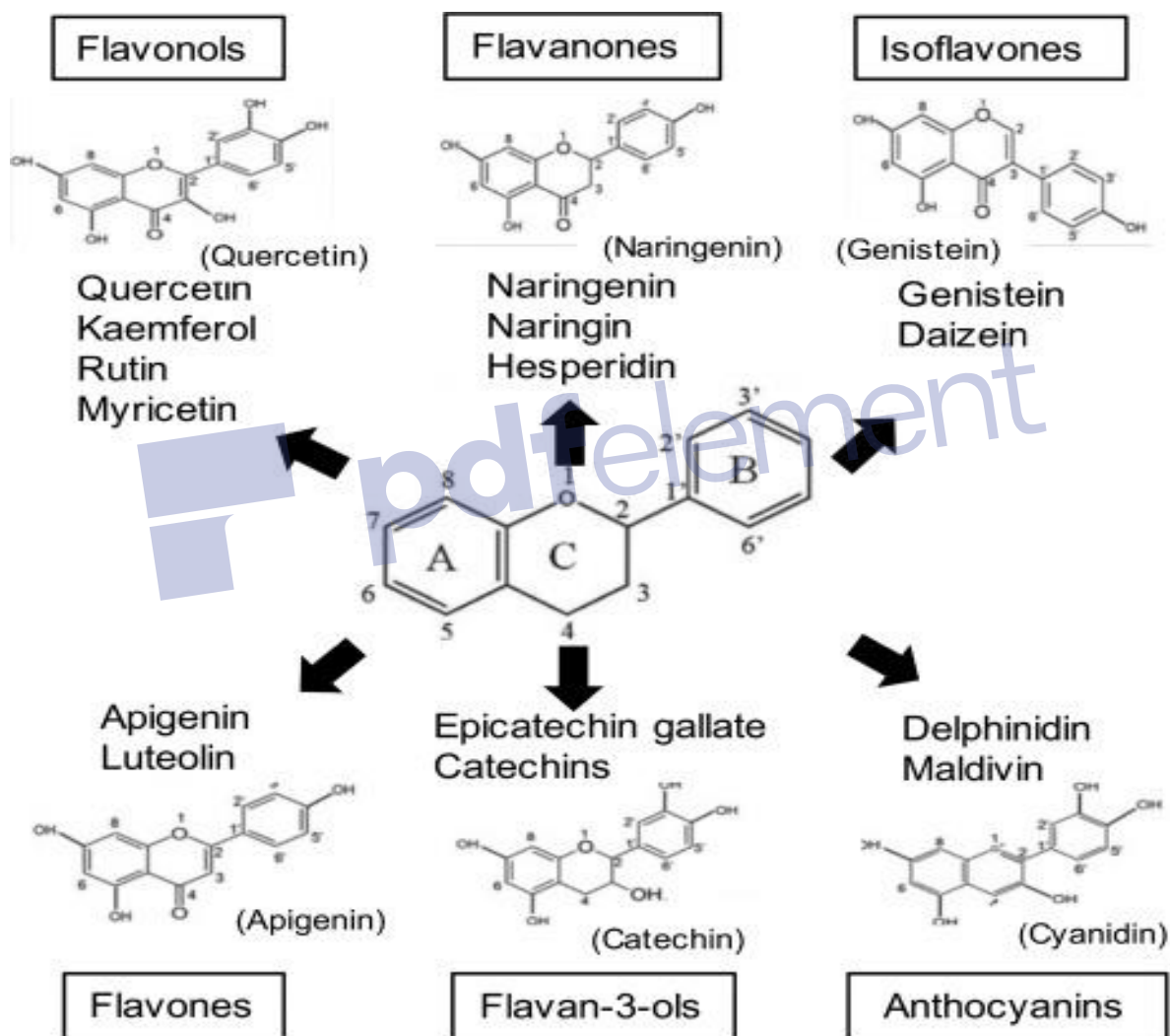


Figure 5: Principales classes des flavonoïdes.

I.3. Description générale de la classe des flavanones:

I.3.1 . Chimie et classification des flavanones :

Les flavanones (2-phenyl- 2,3 dihydro-benzopyran-4-one), une des douze sous-classes des flavonoïdes, est principalement présente dans les agrumes et les légumes où ils sont habituellement trouvés comme 7-O-glycosides (Hadj salem J 2009, Daz M et Resnik SL et al ; 2011).

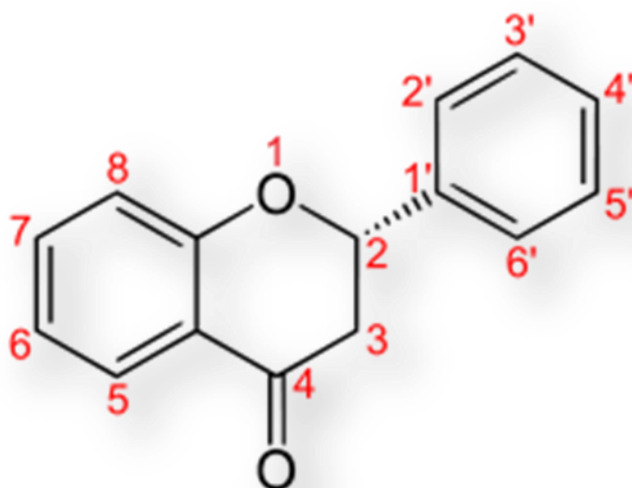


Figure 6 : Squelette de base des flavanones.

Parmi tous les autres flavonoïdes, la sous-classe des flavanones présente une caractéristique unique de posséder un centre chiral à la position C-2. Ces flavanones sont caractérisées par l'absence de double liaison entre C-2 et C-3. Chez les flavanones naturelles, le carbone 2 est normalement de configuration S (**Figure6**) (Wiseman S et van de Put FHMM et al ;2003).

En flavanones, deux formes stéréoisomériques de chaque structure de flavanone sont possibles. (Figure6). La grande majorité des flavanones isolés à partir des plantes sont lévogyre (-) - ou (2S)-flavanones, parce que la réaction enzymatique catalysant la conversion des chalcones en flavanones est stéréospécifique. La structure des flavanones est très réactive et donne lieu à des réactions d'hydroxylations, d'O-méthylations, d'O-glycosylations, et à des réactions de polymérisation, d'acylation dans le but d'augmenter la stabilité, la solubilité, et la biodisponibilité de ces métabolites. Les flavanone-7-O-glycosides représentent une classe importante des flavanones, ce sont des pigments neutralisant les radicaux libres. Ils sont antioxydants et améliorent l'absorption de la vitamine C (Kanaze FI, Bounartzi MI, Georgarakis M et Niopas I et al ;2007).

Ces dérivés ont une substitution glycosylique exclusivement situant en position C-7 (sur le cycle A) (Leontowicz M et al 2006). Ces composés sont d'intérêt commercial en raison de leur multitude d'applications dans la nourriture et les industries pharmaceutiques (Bai Y, Zhao P et al ; 2006).

Les bio-flavonoïdes de citrus sont riches en Rutine, Hespéridine, Eryodictol et Naringénine (Chena L, Huang N, 2011 et Kakuda Y et al ; 2001).

Le tableau suivant (Tableau 1) regroupe les principale flavanones aglycones. Tous ces aglycones ont une structure dans lequel deux groupes hydroxyle sont présents à l'extrémité C-5 et C-7 positions. En hespérétine et isosakuranetin de la C-4' position est méthoxylés (Laencina J et Tomás-Barberá FA et al ; 1997).

Tableau 1 : Principales flavanones aglycones.

Nom de Composé	R ₁	R ₂	R ₃
Hesperetine	OH	OH	OMe
Naringenine	OH	H	OH
Taxifilin	OH	OH	OH
Isosakuranetin	OH	H	OMe

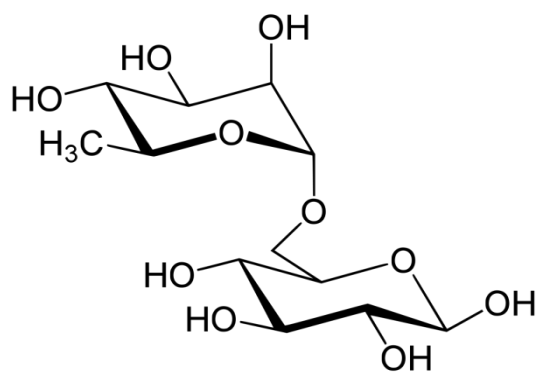
Le tableau suivant (Tableau 3) regroupe les principale flavanones-O-glycosides, et la (Figure 7) représente la structure de Rutinose et neohesperidose (Hsieh YS et Chu SC et al ; 2007).

Tableau 2 : Principales flavanones-O-glycoside.

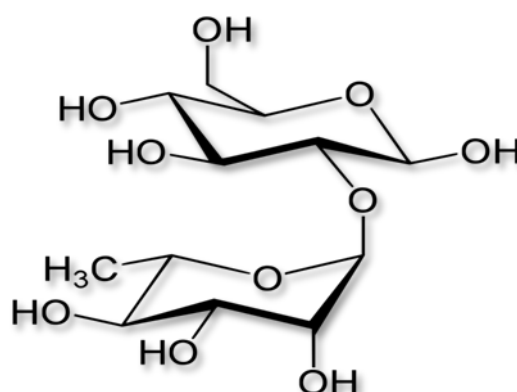
Nom de Composé	R ₁	R ₂	R ₃
Hesperetin7-O-rutinoside (Hesperidine)	O-Ru ^a	OH	OMe
Naringenin7-O-neohesperidoside (Naringine)	O-Nh ^b	H	OH
Naringenin7-O-rutinoside (Narirutin)	O-Ru ^a	H	OH
Hesperetin7-O- neohesperidoside (Neohespéridine)	O-Nh ^b	OH	OMe

a :O-Ruthinose

b :neohesperidose.



Rutinose



Neohesperidose

Figure 7: Structure de la Rutinose et neohesperidose.

I .3 .2. Définitions et Chimie de la naringine :

La naringine, chimiquement connue sous le nom de 4',5,7-trihydroxyflavanone-7-rhamnoglucoside ($C_{27}H_{32}O_{14}$, poids moléculaire : 580,5), est un glycoside de flavone présent dans de nombreuses espèces végétales, en particulier les agrumes, aux activités pharmacologiques et biologiques remarquables. C'est l'un des principaux composants actifs de diverses plantes médicinales, telles que *Citrus medica* L. (CM) et *Citrus aurantium* L. (CA) (**Alam et al., 2014 ; Zhang et al., 2014**). La structure chimique de la naringine a été annotée pour la première fois en 1928 par Inubuse et Asahina (**EFSA et al., 2011**). Dans une étude, la naringine a été isolée de l'extrait brut de peau de *C. aurantium* après séparation HPLC et sa structure a été confirmée par spectrométrie de masse à ionisation par électrospray. La masse prévue pour la naringine était de 580 Da (**Zhang et al., 2018a**). La naringine est dérivée de la naringénine et est responsable de l'amertume des agrumes et de leurs produits (**Konno et al., 1982**). Il peut être hydrolysé par l'activité rhamnosidase de la naringinase, qui peuvent ensuite être hydrolysés par le composant bD-glucosidase de la naringinase, en naringénine et en glucose (**Real et al., 2007**).

Il a été démontré que la naringine module diverses expressions enzymatiques et protéiques, exerçant ainsi des activités thérapeutiques potentielles. Il a été démontré que la naringine affecte de manière significative la prolifération cellulaire et la différenciation ostéogénique (**Dai et al., 2009**). La naringine s'est également avérée efficace pour diminuer l'expression de nombreux facteurs de signalisation impliqués dans la réponse inflammatoire.

Par exemple, l'interleukine-8 (IL-8), le facteur de nécrose tumorale- α (TNF- α), l'interleukine-6 (IL-6), l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) et le facteur 2 lié au facteur nucléaire érythroïde 2 (Nrf2) (**Habauzit et al., 2011**). Il a également été rapporté qu'il diminue le syndrome métabolique par une régulation à la baisse de l'expression d'enzymes gluconéogéniques clés et une régulation à la hausse de la protéine kinase activée par l'AMP. De plus, il diminue l'activité de la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A réductase et améliore la production de métabolites d'oxyde nitrique. La naringine présente également des actions antigénotoxiques et diminue les dommages à l'ADN en contrôlant la génération de radicaux libres et l'expression de médiateurs oxydatifs (**Chen et al., 2016**). Il a des effets bénéfiques sur de nombreuses maladies du système nerveux central, notamment l'épilepsie, la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer (**Jäger et Saaby et al, 2011**), et il a été démontré qu'il a une activité de piégeage des radicaux dose-dépendante et une diminution du stress oxydatif (**Rajadurai et Prince et al, 2007**). Dans l'ensemble, la naringine peut être considérée comme un composé naturel prometteur qui procure divers avantages pour la santé.

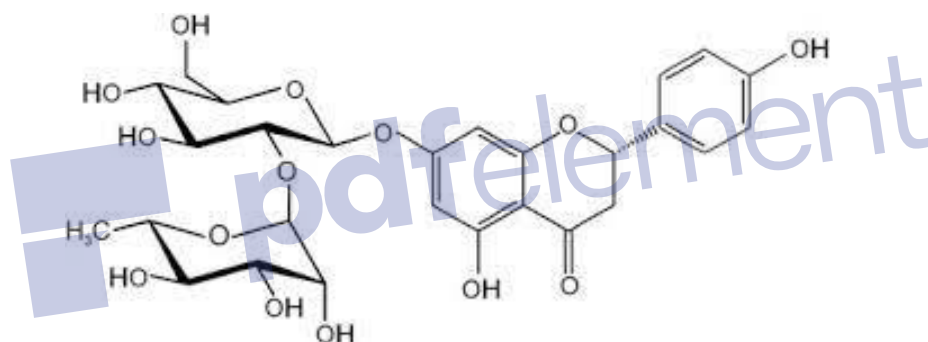


Figure 8 : Structure de la naringine.

I.3 .3. Sources de la naringine :

La naringine est l'un des principaux citroflavonoïdes isolée en grands nombres des croûtes jetées de l'orange ordinaire *Citrus aurantium* L.= l'oranger amer (**Vijeender K et Reddy KV et al ;2005**), *C. sinensis* = l'oranger doux(**Chandrasekhar S et al, 2005**)*C. unshiu* *Citrus limon* = le citronnier (**Johnson, A.R., et al., 2013**), *Citrus aurantifolia* = le limettier (Citron vert) (**Ishii K., et al., 1997**), *Citrus paradisi* (maxima) = le pamplemoussier(**Ghoul M et al ;2004**), *Citrus reticulata* = le mandarine (**Ishii K., et al., 1997**), *Citrus medica*= Citron, et d'autres espèces du genre *Citrus* (appartenant à la famille des Rutacées) (**Keli S.O., et al., 1996**). Aussi ; dans des genres Fabacées, Bétulacées, Lamiacées et Papilionacées (l'argousier (*Hippophaë rhamnoides*.) (**Kim J.H., et al., 2015**).

I.3.4. Toxicité de la naringine :

En général, les citroflavonoïdes, y compris la naringine semblent être extrêmement sûr et sans effets secondaires, même pendant la grossesse. Basé sur une expérience chez des souris mâles et femelles, il a été établi que la naringine phosphorylée (PH) n'a pas été toxique tant pour l'organisme et de tissus, facilement assimilables, non accumulative et n'a pas causé de réactions allergiques (**Salim S., et al., 2013**).

I.5. Réactivité et activité biologique de la naringine :

A plusieurs fonctions biologiques comme antioxydante, antimicrobienne, anti-inflammatoire, anti-carcinogène et comme protecteur vasculaire :

I .5.1. Antibactérienne :

Les flavonoïdes sont des substances antibactériennes efficaces contre une large gamme de micro-organismes (**Basile et al., 1999**) . Leur activité est probablement due à leur capacité à se complexer avec les protéines extracellulaires et solubles et à se complexer avec la paroi bactérienne.

La rutine, forme glycosyle de la quercétine, est la plus active des flavonoïdes avec une activité anti-listeria (**Rodríguez-Vaquero et al., 2007**). Les flavones sont de forts inhibiteurs des bactéries Gram-, alors que les flavonoïdes contenant deux ou trois groupements hydroxyles sur le cycle A et B sont plus actifs contre les bactéries Gram+ (**Orhan et al., 2007** **Rauha et al. 2000**) ont rapporté que la quercétine et la naringine sont actives contre *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* (**Orhan, I.; Özcelik, et al, 2007**).

CHAPITRE 2

ANTIBACTERIEN



II .1. Définition les bactéries :

Les bactéries sont des micro-organismes de taille microscopique allant de 1 à 5 micromètres (μm). Leur forme diffère en fonction de la composition de leur paroi, elles peuvent donc être sphériques (cocci), en bâtonnets (bacilles) ou encore incurvées/spiralées (spirochètes, vibrions...). La composition lipidique (peptidoglycane) de cette paroi permet, grâce à des processus de coloration, d'identifier les bactéries. La plus connue est la **coloration de Gram** qui, grâce à l'utilisation du violet de gentiane et d'alcool, différencie les bactéries à **Gram positif** (de couleur violet, paroi riche en peptidoglycane) des bactéries à **Gram négatif** (de couleur rose, paroi pauvre en peptidoglycane).

Cependant, d'autres colorations existent comme celle de **Ziehl-Neelsen** utilisée pour les *mycobactéries*, des *bacilles acido- alcool-résistants* (BAAR) insensibles à la coloration de Gram. Les cellules bactériennes sont des cellules procaryotes, c'est-à-dire qu'elles n'ont pas de noyau qui sépare leur matériel génétique (ADN) du cytoplasme. En plus de l'ADN, celui-ci contient des ribosomes et des plasmides. Les plasmides sont des petits fragments d'ADN extérieurs au noyau, capable d'autoréplication, et qui confèrent aux bactéries certaines propriétés comme la résistance aux antibiotiques. D'autres éléments peuvent également se retrouver sur certaines bactéries : la capsule, pour une meilleure résistance au système immunitaire de l'hôte ; le flagelle, pour une meilleure mobilité ; ou encore les pili, pour une meilleure adhésion aux substrats.

Les bactéries se développent dans des milieux favorables qui diffèrent selon les espèces : éléments nutritifs, température, humidité, pH, O₂ (**aérobic, anaérobic...**). Elles se multiplient rapidement par division cellulaire (ou scissiparité), si bien qu'en moins d'une demi-heure, le nombre de bactéries est doublé (**Berche et al, 2007**).

II .2. La morphologie cellulaire :

Les cellules bactériennes sont caractérisées par leur taille, leur poids, leur morphologie et leur type de regroupement spécifique. Ce sont des caractères communs au sein d'une espèce voire même du genre bactérien.

II .2.1. Taille des bactéries :

Les bactéries sont des **organismes unicellulaires**. Cela signifie que chaque bactérie est constituée d'une seule cellule. Il en est tout autrement chez les humains, qui contiennent quant à eux plus de mille milliards de cellules (**Angert et al., 1993**).

Les cellules bactériennes sont beaucoup plus petites que les cellules humaines. Elles peuvent mesurer environ 1 à 10 μm de long, mais la majorité d'entre elles n'ont qu'un diamètre d'environ 1 à 2 μm . Un micromètre (1 μm) est 1 000 fois plus petit qu'un millimètre. C'est *vraiment* petit! C'est beaucoup plus petit que le globule rouge humain, qui est (en moyenne) d'environ 7 μm de diamètre (Schulz *et al.*, 1999).

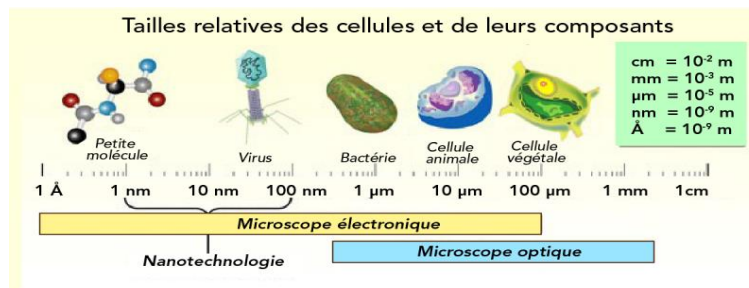
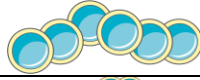
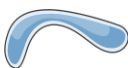
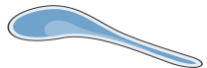


Figure 9 : Taille des bactéries.

II .2.2.La forme et associations cellulaires :

Quant aux formes et au poids des cellules bactérienne, celles-ci diffèrent selon les espèces. Le poids d'une bactérie est d'environ 10^{-12}g . Concernant les formes, les plus retrouvées sont; les formes coques (sphériques), les formes bacilles (bâtonnets allongés), les formes coccobacilles (formes intermédiaires entre coques et bacilles, ovoïdes), les formes incurvées (vibrions), les formes spiralées dont certaines sont rigides (spirilles) et d'autres sont flexibles (spirochètes), les formes filamenteuses (mycélium des actinomycètes), les formes pédonculées (allongement dans l'extrémité) et enfin des formes pléomorphes (changent de formes). Toutes ces formes peuvent être retrouvées seules, associées par deux (diplococoques, diplobacilles), en chaînette (streptocoques, streptobacilles), en amas (groupées), en tétrades (par quarte), amas en grappe de raisin,...etc (Freney J , Renaud F et al2012). Dans le tableau ci-dessous, les formes les plus retrouvées avec leurs caractéristiques, les groupements fréquents et les schémas correspondants de chaque forme sont rapportés (Tableau3).

Tableau 3: Quelques types morphologiques fréquemment retrouvés chez les bactéries.

Formes	caractéristiques	Regroupement	Schéma	Genre bactérien
Coques	Forme sphérique généralement de 0.5 à 2 μm	Isolés		Micrococcus
		Diplocoques		Enterococcus
		Chaînettes		Streptococcus Enterococcus
		Amas réguliers, grappe de raisin		Staphylococcus
		Tétrades		Sarcina Deinococcus
Bacilles (Bâtonnets)	Forme droite Jusqu'à 6 μm de long, 0.5 à 2 μm de large. Extrémités plates, arrondies ou carrées	Souvent isolés mais retrouvés également en paires ou en chaînettes (streptobacilles)		Bacillus Lactobacillus Pseudomonas Clostridium Mycobacterium
Coccobacilles	Forme intermédiaire entre les coques et les bacilles. Courts et larges, ressemblant à des coques	Isolés ou en paires		Brucella Pasteurella
Incurvés	Forme de virgule	Le plus souvent Isolés		Vibrio
Spirilles	hélices rigides en spirale	Souvent en chaînettes		Spirulina Rhodospirillum
Spirochètes	hélices flexibles	Isolés		Treponema Borrelia
Filamenteuses	réseau de longs filaments(Mycélium)	Ramifié ou non ramifié(souvent en chaînettes)		Streptomyces
Pléomorphes	Change de forme	Isolés		Haemophilus Mycoplasma
Pédonculées	Pédicule à grande capacité adhésive due aux polysaccharides	Isolés		Caulobacter

II. 3. Structure et anatomie de la cellule bactérienne :

Les éléments essentiels (constants)

Les principales structures sont la **paroi cellulaire** et les **membranes**, le **cytoplasme** avec les **inclusions** et le **nucléoïde** correspondant au noyau d'eucaryote.

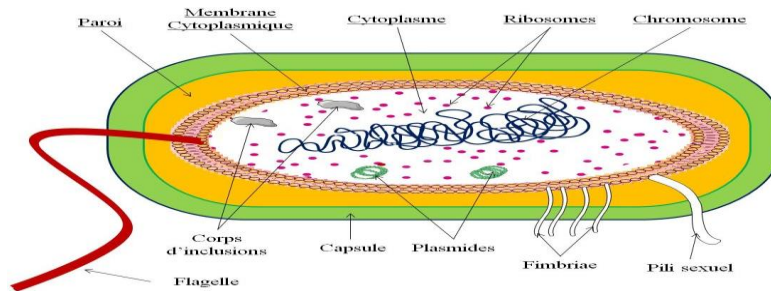


Figure 10 : Structure de la cellule bactérienne

- **Pili :** Structures semblables à des cheveux qui aident la bactérie à se fixer à des surfaces et à d'autres bactéries.
- **Plasmides :** Matériel génétique (molécules d'ADN).
- **Ribosomes :** Structures qui fabriquent des protéines.
- **Cytoplasme :** Matière vivante semblable à un gel dans laquelle les ribosomes et le matériel génétique sont contenus.
- **Membrane plasmique :** Fine couche de phospholipides et de protéines qui régule le mouvement des nutriments dans et hors de la cellule.
- **Paroi cellulaire :** Structure rigide qui entoure la cellule et protège la membrane plasmique.
- **Capsule :** Troisième couche qui aide à prévenir le dessèchement de la bactérie ou à empêcher qu'elle soit engloutie par des microorganismes plus gros (présente uniquement dans certains types de bactéries).
- **Nucléoïde :** Amas de matériel génétique (ADN).
- **Flagelle :** Prolongement cellulaire qui aide les bactéries à se déplacer et à percevoir leur environnement.

II .3.1. Paroi bactérienne :

La paroi bactérienne est un élément constant présent chez la plupart des bactéries. C'est un élément de structure **rigide** situé à l'extérieur de la membrane plasmique. Elle est simple de conception et à la fois sophistiquée et complexe dans son assemblage. Cette structure est si indispensable qu'elle est historiquement une cible privilégiée des thérapies antibactériennes (Betalactamines, fosfomycine, vancomycine, bacitracine...etc.) (Julio, A et al ; 2015).

II .3.1.1. Composition chimique :

Plusieurs éléments constituent la paroi bactérienne. Selon la nature chimiques, les composants suivants sont fréquemment retrouvés ; peptidoglycane, acides téichoïques et acides lipotéichoïques, lipopolysaccharides, protéines, lipides et lipoprotéines. La composition de la paroi n'est pas constante chez toutes les bactéries. En effet, dans le domaine des *Bacteria*, il existe deux types de parois que l'on rencontre chez les bactéries dites "à Gram positif" et les bactéries dites "à Gram négatif". Ces différences de structure bien visibles en microscopie électronique à transmission sont à la base de la coloration de Gram. Dans cette partie, la structure de la paroi des bactéries Gram(+) et Gram(-) seront développées séparément. Concernant les constituants de la paroi, la structure du peptidoglycane sera élucidée en premier car il s'agit d'un élément commun présent dans les deux types de paroi, puis les autres structures seront traitées selon leur présence dans le type de la paroi étudiée (Julio, A et al ; 2015).

II.3.1.2. Structure du peptidoglycane :

Le peptidoglycane, constituant clé de la paroi, est assez rigide pour fournir une intégrité physique à la cellule mais aussi suffisamment flexible pour permettre son expansion (Höltje, 1998). Brièvement, le peptidoglycane (appelé également mureine ou mucopeptide) est une structure macromoléculaire continue dont les principaux composants sont des chaînes linéaires de glycanes, reliées entre elles par des petites chaînes peptidiques. Ces unités répétées de glycanes sont composées de l'alternance d'unités de N-acétylglucosamine (NAG) et d'acide N-acétylmuramique (NAM). Toutes les liaisons entre les sucres sont de type β 1-4. Le groupement carboxyle de chaque NAM est substitué par une sous-unité peptidique de cinq résidus d'acides aminés (ex : L-Ala- γ -D-Glu- mDAP-D-Ala-D-Ala) (figure11). Il est à noter que le dernier acide aminé de la chaîne est enlevé en fur et à mesure de l'élongation de la chaîne du peptidoglycane. Les trois acides aminés ;

l'acide D-glutamique (D-Glu), la D-alanine (D-Ala) et l'acide méso-diaminopimélique (DAP), ne sont pas présents dans les protéines.

Donc, ces acides aminés de la série D empêchent la dégradation par la plupart des peptidases qui reconnaissent que les isomères de la série L. La synthèse du peptidoglycane nécessite plus de trente enzymes et a lieu dans différents compartiments de la cellule bactérienne (cytoplasme, membrane et paroi). Les chaînes de peptidoglycane voisines sont interconnectées (entre le 3^{ème} acide aminé d'une chaîne et le 4^{ème} acide aminé d'une autre chaîne voisine) soit par une liaison peptidique directe, soit par une courte chaîne d'acides aminés entre deux sous-unités peptidiques (ex : Gly-Gly-Gly-Gly-Gly). Bien que la composition des peptides puisse varier d'une espèce à l'autre, la composition du squelette carbohydrate est généralement considérée comme étant constante (**Roujeinikova, A et al ; 2008**).

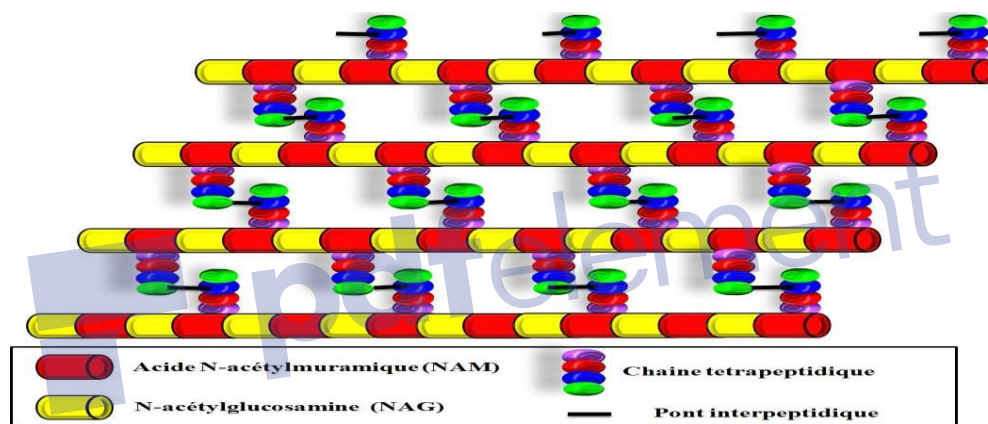


Figure 11 : Structure du peptidoglycane

II.3.1.2.1. Parois des bactéries à Gram positif :

La plupart des bactéries à Gram positif présente une paroi épaisse constituée principalement de peptidoglycane (jusqu'à 80nm). De plus, elles contiennent généralement une grande quantité de polymères secondaires dont les acides téichoïques et les acides lipotéichoïques, et peuvent contenir également des protéines pariétales (ex: adhésines, couche S...etc.) (**Figure12**). L'espace périplasmique, situé entre la membrane cytoplasmique et la paroi, est petit par rapport à celui des bactéries Gram-négatives et peu de protéines sont retrouvées fixées au côté extérieur de la membrane cytoplasmique. Il est admis que la plupart des protéines secrétées par les cellules traverse habituellement le peptidoglycane. Ces dernières sont considérées comme des exo-enzymes, car elles servent souvent à dégrader les substrats nutritifs trop grands pour être transportés à travers

la membrane cytoplasmique (Roujeinikova, A et al ; 2008).

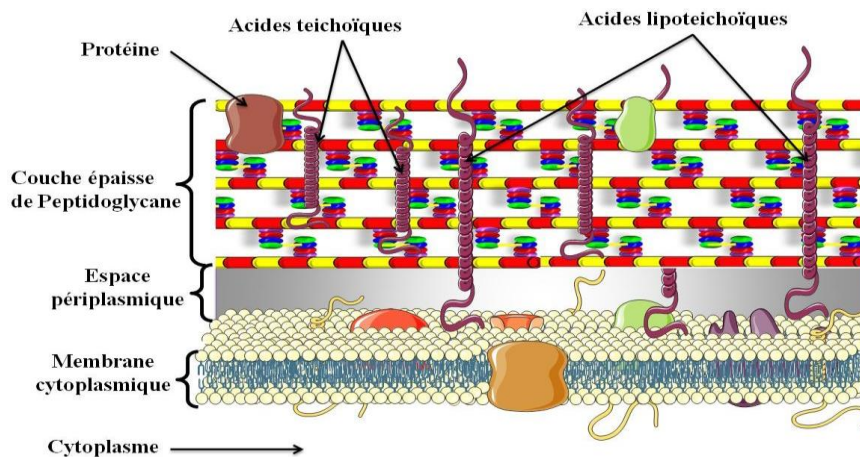


Figure 12: Ultrastructure de la paroi d'une bactérie à Gram positif.

La structure des acides téichoïques et les acides lipotéichoïques

Les acides téichoïques (AT) et les acides lipotéichoïques (ALT) sont formés d'un squelette d'alditol (glycérol ou ribitol) connecté par des liaisons phosphates et sont reliés aux résidus N-acétylmuramique du peptidoglycane (AT) ou à la membrane plasmique (ALT) (Roujeinikova A, et al ; 2008).

D'autres molécules comme le glucose ou le D-alanine, peuvent se lier aux résidus de glycérol ou de ribitol (**Figure 13**). Les AT et ALT sont considérés comme des éléments importants qui stabilisent davantage la structure de la paroi bactérienne. Par ailleurs, plusieurs fonctions ont été attribuées aux AT et ALT notamment leur implication dans la pathogénicité. Ces acides téichoïques contribuent à la résistance aux peptides antimicrobiens, la formation de biofilms, l'adhésion aux cellules eucaryotes et stimulent l'inflammation par exposition des cellules au complément (Fabretti et al., 2006; Jett et al., 1994).

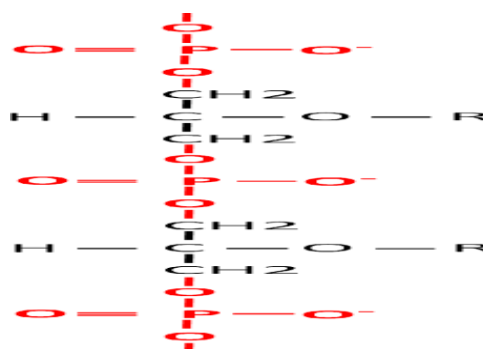


Figure 13 : La structure d'un acide téichoïque. Un segment d'acide téichoïque comprenant des glycérols reliés par des molécules de phosphate. La chaîne R.

Exemples de bactéries à Gram positif

Beaucoup de bactéries forment le groupe des bactéries à Gram positif à l'instar des genres *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Listeria* ect.

II.3.1.2.2. Les parois des bactéries à Gram négatif :

La paroi des bactéries Gram-négatives est plus complexe que celle des bactéries Gram-positives. Elle est composée d'une mince couche de peptidoglycane qui ne représente pas plus de 10% du poids total de la paroi avec une épaisseur d'environ 2 nm chez certaines espèces comme *Escherichia coli* (Prescott *et al.*, 2013).

La particularité de la paroi des bactéries Gram-négatives est qu'elle est entourée par une membrane externe en plus de sa membrane cytoplasmique. Entre les deux membranes s'intercale le peptidoglycane qui est, lui-même, attaché à la membrane externe grâce aux lipoprotéines (lipoprotéines de Braun). L'espace périplasmique est différent de celui des bactéries à Gram+, il couvre tout l'espace entre les deux membranes (Figure 14) et peut atteindre 71 nm voire 20 à 40% du volume cellulaire total (Prescott *et al.*, 2013). Cet espace contient des enzymes qui participent à la nutrition (hydrolases) et des protéines qui sont impliquées dans le transport de molécules à l'intérieur de la cellule (Roujeinikova, A *et al.* ; 2008).

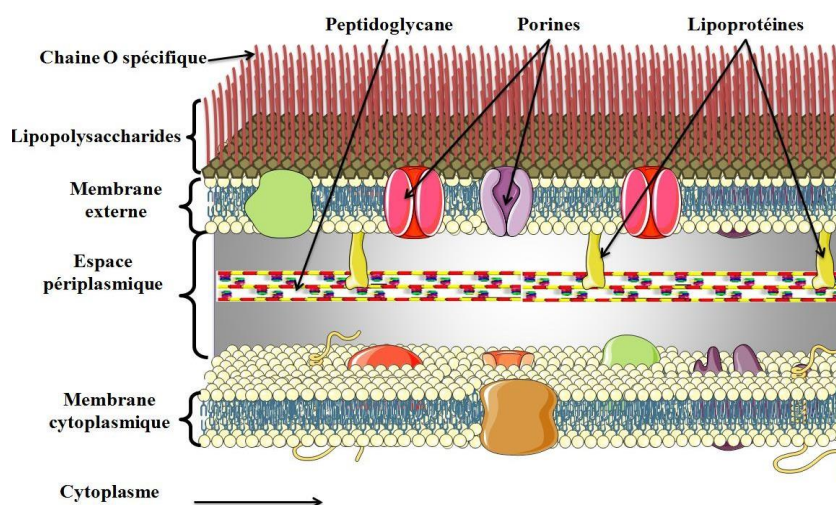


Figure 14 : Ultrastructure de la paroi d'une bactérie à Gram négatif.

La membrane externe est une double couche de phospholipides qui renferme plusieurs protéines et des lipopolysaccharides (LPS) (**Figure15**). Ces dernières (LPS), sont de grandes molécules composées de trois parties; le *lipide A* enfoui dans la membrane externe, le *polysaccharide central* composé de glucides (10 glucides chez *Salmonella*) et la chaîne latérale O à l'extrémité appelée également *l'antigène O* qui est une courte chaîne de polysaccharide particuliers dont la composition varie selon les espèces (spécifiques). Les LPS jouent plusieurs rôles. En effet, ils contribuent à la charge négative de la surface externe de la bactérie, il peut faciliter l'adhésion de la bactérie à des surfaces, il participe à la sélectivité de la membrane externe en empêchant la perméabilité de certaines molécules et enfin, il suscite une réponse immunitaire chez l'hôte via l'antigène O et agit également comme une endotoxine à cause de la toxicité du lipide A (**Fabretti et al., 2006; Jett et al., 1994**).

La perméabilité de la membrane externe est plus importante par rapport à celle de la membrane cytoplasmique et ce malgré le rôle des LPS dans l'imperméabilité de certaines molécules. Ceci est dû à la présence de protéines spéciales de forme d'un tube appelées "porines". Ces porines de caractère aqueux laissent rentrer des petites molécules inférieures à 600 daltons (**Prescott *et al.*, 2013**). Cependant, les plus grosses molécules traversent la membrane externe par les transporteurs spécifiques (ex : vitamine B12).

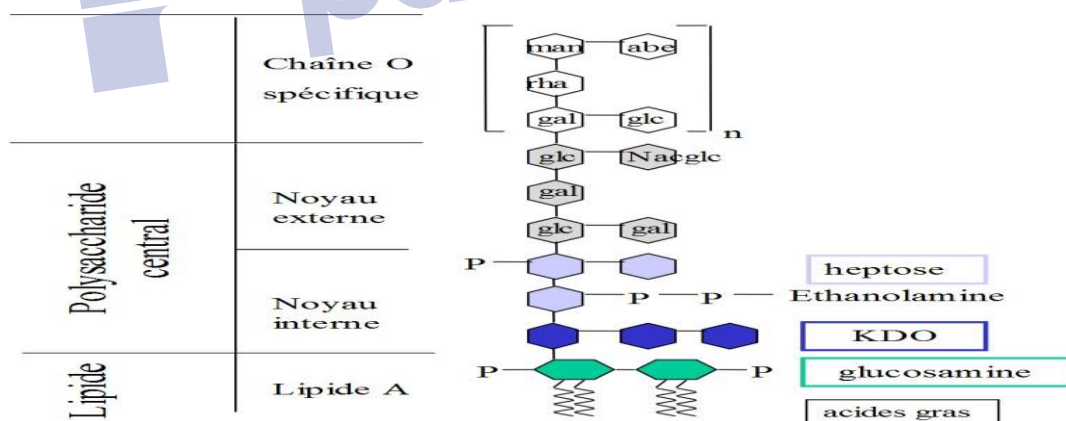


Figure 15 : La structure de lipopolysaccharides (Julio, 2015).

Exemples de bactéries à Gram négatif

Beaucoup de bactéries forment le groupe des bactéries à Gram positif à l'instar des genres *Escherichia*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Vibrio*, *Neisseria*, *Rhizobium*, *Bordetella* etc.

II.3.1.3. COLORATION DE GRAM :

En 1884, le bactériologiste danois Hans Christian Gram a mis au point le protocole de la coloration de Gram. C'est une coloration différentielle qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne.

La coloration de GRAM est la base de la taxonomie bactérienne (**Bergey & Holt et al, 2000**); elle a permis de diviser les bactéries en deux groupes distincts à savoir; les bactéries à Gram positif, caractérisées par une paroi très riche en peptidoglycane (couche épaisse) et en acide teichoïques et lipoteichoïques (ce qui empêche la pénétration des solvants organiques tel que l'alcool et l'acétone), et les bactéries à Gram négatif, caractérisées par une paroi très riche en lipides et lipopolysaccharides grâce à la présence d'une membrane externe. Cependant, la couche du peptidoglycane est beaucoup moins importante par rapport aux bactéries Gram positives. Ce qui permet la pénétration des solvants organiques(**Bergey & Holt et al, 2000**).

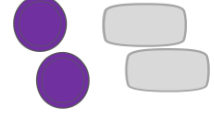
La méthodologie de la coloration de GRAM qui est rapide et précise, consiste à l'application, sur un frottis fixé, de deux colorants basiques séparés par une étape de décoloration (**Tableau4**). Tout d'abord, recouvrir un frottis fixé avec le violet de gentiane ou avec le crystal violet. Puis, le lugol sera appliqué afin de fixer la première coloration.

Ensuite, l'étape la plus importante qui distingue les deux types de parois (Gram+ et Gram-) est la décoloration à l'éthanol ou l'acétone (ou le mélange éthanol/acétone). Enfin, une contre coloration avec de la fuschine qui va colorer uniquement les bactéries décolorées avec de l'éthanol (Bactéries Gram-) qui vont apparaitre en rose. En effet, les bactéries non décolorées par l'éthanol (bactéries à Gram+) gardent toujours leur première coloration et paraissent alors en violet.

Il est à noter qu' un rinçage à l'eau est nécessaire après chaque étape pour enlever l'excès de colorant et une décoloration massive (long) peut entraîner la décoloration de certaines bactéries à Gram+ (**Genty, C et al ; 2013**).

NB : L'utilisation de bactéries vieilles (âgées) peut fausser le type de Gram de certaines bactéries Gram+ qui peuvent paraître en rose à cause de vieillissement de la paroi bactérienn

Tableau 4: Illustration des étapes de la coloration de GRAM.

Etape	Observation	Résultats	Interprétation
Recouvrir le frottis préalablement fixé avec le violet de gentiane et laisser agir 1mn puis rincer à l'eau		Toutes les bactéries sont colorées en violet	violet de gentiane est un colorant basique qui colore toutes les structures chargées négativement
Appliquer le lugol et laisser agir 1mn puis rincer à l'eau		Toutes les bactéries restent colorées en violet	Le lugol est un fixateur et mordant de la première coloration.
Décoloration à l' éthanol pendant 20s puis rincer à l'eau		Les bactéries à Gram positif restent colorées en violet mais les bactéries à Gram négatif sont décolorées	A l'inverse des bactéries Gram-, La paroi des bactéries Gram+ sont imperméables aux solvants organiques.
Contre coloration avec de la fuschine puis rincer à l'eau	Bactéries Gram-  Bactéries Gram+	Les bactéries à Gram positif sont colorées en violet et les bactéries à Gram négatif sont colorées en rose.	Les bactéries à Gram- prennent la coloration de la fuschine (vu qu'elles étaient incolores), alors que les bactéries à Gram+ gardent toujours la première coloration.

II .3 .1. 4. Cas de parois particulières :

Les parois bactériennes ne sont pas toutes identiques à celles des bactéries Gram+ et des Gram-conventionnelles. Car certaines bactéries présentent des parois particulières voire même absentes. Chez les *Mycoplasmes*, la paroi bactérienne est absente. De ce fait, ils sont insensibles aux antibiotiques ciblant la paroi bactérienne. (**Prescott et al., 2013**).

Vu l'absence de paroi, les mycoplasmes ont tendance à être pléomorphes. Le genre *Chlamydia* par exemple, qui fait partie des bactéries à Gram-, le peptidoglycane est inexistant. Ce sont des parasites intracellulaires obligatoires. Chez l'homme, *Chlamydia trachomatis* est responsable de

l'urétrite (maladie sexuelle transmissible) et de la cécité évitable (trachome) (**Prescott et al., 2013**). Le genre *Mycobacterium* dont l'espèce *Mycobacterium tuberculosis* fait partie de ce groupe de bactérie Gram+, cependant en plus de peptidoglycane, leur paroi est très riche en acides mycoliques (lipide de la classe des cirides) qui résulte d'une estérification entre un acide gras long avec un alcool long). Ces bactéries sont dites "acido-alcool-résistantes" et elles sont mises en évidence par la coloration de Zielh Nielsen (**Ladjouzi, R et al ; 2013**).

Parmi les parois anormales des bactéries; les protoplastes et les sphéroplastes. Ces deux appellations désignent respectivement des bactéries à Gram + et à Gram - ayant un peptidoglycane dégradé par un agent comme le lysozyme.

Les archéobactéries représentent un domaine à part très différent de celui des bactéries. Ces Archaea ne présentent pas de peptidoglycane habituel, mais certaines possèdent une pseudomureine composée de N-acétyl-alosaminuronique à la place de l'acide N- acétylmuramique (**NAM**) (**Ladjouzi, R et al ; 2013**).

II .3 .1. 5. FONCTIONS :

Afin de mettre en évidence les rôles de la paroi bactérienne, l'expérience au lysozyme a été utilisée. Le lysozyme clive les liaisons β (1-4) glycosidiques entre le NAG et le NAM. Il en résulte une destruction totale du peptidoglycane chez les bactéries Gram(+), et une fragmentation de celui-ci chez les Gram(-) car le peptidoglycane est moins accessible à cause de la membrane externe (**Pace, N. R.et al ., 1993**).

L'expérience démontre que l'hydrolyse du peptidoglycane par le lysozyme rend la bactérie sensible à la pression osmotique. Donc la mise en suspension de ces bactéries dans un milieu hypotonique engendre une lyse cellulaire. Cette sensibilité n'est pas retrouvée chez les bactéries ayant un peptidoglycane intact. Cependant, la mise en suspension des bactéries (Gram + et Gram -) ayant un peptidoglycane dégradé dans un milieu isotonique permet la formation des protoplastes (à partir des bactéries à Gram +) et des sphéroplastes (à partir des bactéries à Gram-)(**Pace, N. R.et al ., 1993**).

Les protoplastes ne gardent plus les propriétés antigéniques de la bactérie, ne se divisent plus, ne fixent plus les bactériophages et sont immobiles. Alors que les sphéroplastes conservent toutes les propriétés initiales de la bactérie (**Pace, N. R.et al ., 1993**).

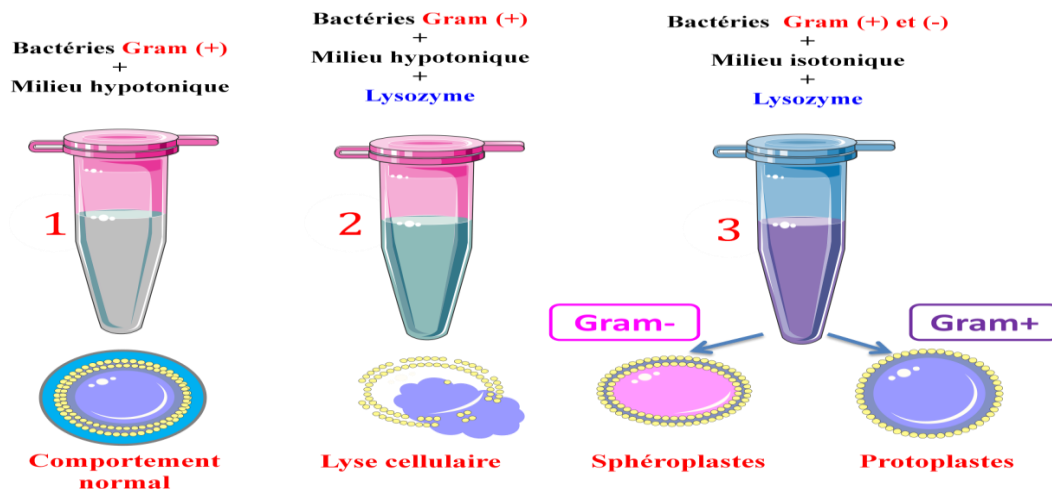


Figure 16: Formation de protoplastes et de sphéroplast.

A partir de cette expérience, les rôles de la paroi bactérienne sont déduits. Grâce à la paroi, la bactérie peut résister à la pression de turgescence exercée par le cytoplasme bactérien (une pression d'environ 2 barres), ainsi qu'à diverses agressions du milieu environnemental. De plus, elle fournit la forme et la structure caractéristique à la cellule grâce à la rigidité et l'élasticité du peptidoglycane. D'autres rôles sont également attribués à la paroi, par exemple, elle permet la fixation des bactériophages, elle participe à la mobilité du fait qu'une bonne partie du flagelle est maintenue par la paroi. Elle joue un rôle de barrière à perméabilité sélective et enfin contribue à la toxicité. En effet, chez les bactéries à Gram -, le LPS est une endotoxine qui peut donner des fièvres et lésions (Roujeinikova, A et al ;2008).

II.3.2. Membrane plasmique :

La membrane plasmique (ou cytoplasmique) est un élément de structure fluide qui entoure le cytoplasme et se situe sous la paroi bactérienne. Généralement, c'est une couche fine de 7.5 à 8 nm d'épaisseur, organisée, asymétrique, flexible et dynamique. Plusieurs antibiotiques ciblent la membrane cytoplasmique de bactéries telles que les polymyxines et polypeptides antimicrobiens (Stolz, J. F et al,1993).

II.3.2.1. Structure et composition chimique :

Au microscope électronique, les membranes cytoplasmiques des bactéries apparaissent en triple feuillet; deux feuillets denses limitant une couche claire. De point de vue moléculaire, la

membrane cytoplasmique bactérienne (**Figure17**) est principalement constituée de lipides (de 30 à 40%) et de protéines (de 60 à 70%). Les glucides sont quantitativement des constituants mineurs et souvent associés aux lipides (glycolipides) ou aux protéines (glycoprotéines) (**Stolz, J. F et al ;1993**).

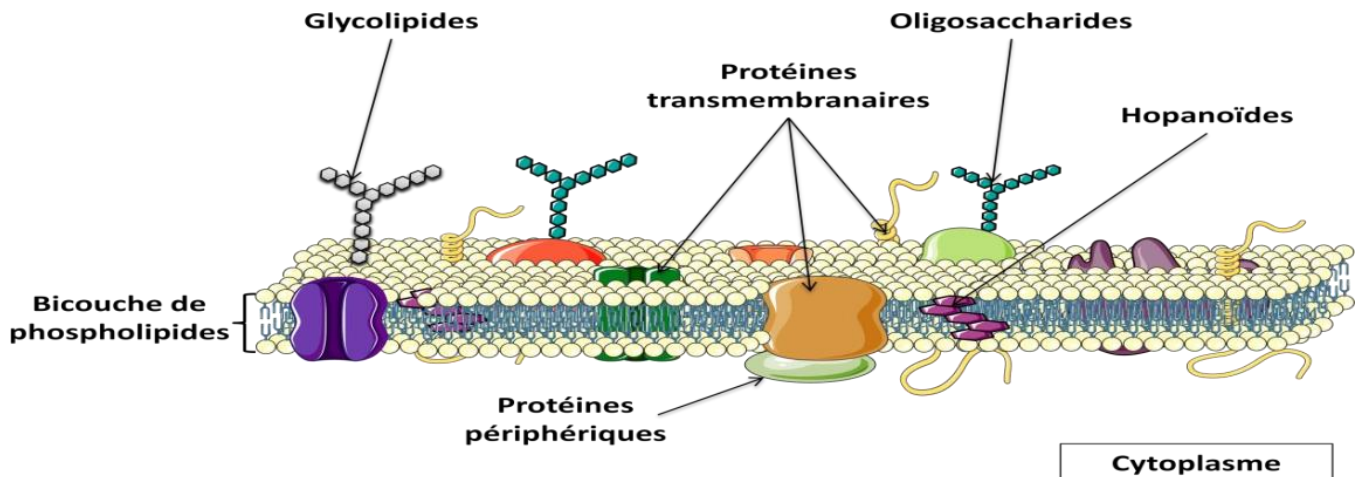


Figure 17 : Ultrastructure de la membrane plasmique.

Les lipides membranaires de bactéries :

La fraction lipidique représente de 30 à 40% des molécules totale de la membrane. La nature chimique des lipides membranaires est essentielle pour qu'il soit capable de former une bicouche lipidique. La pluparts de ces lipides (ex : les phospholipides), présente une structure asymétrique avec deux extrémités à savoir une extrémité polaire qui interagissent avec de l'eau (hydrophile) et une autre non polaire (hydrophobe) (**Figure 18**) (**Singleton, P. & Dusart, J et al ; 1999**).

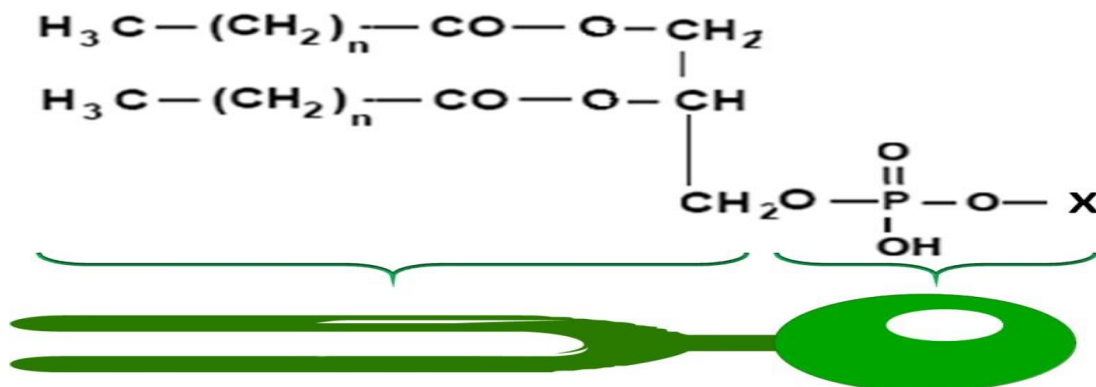


Figure18: Structure des phospholipides membranaires.

✚ Les phospholipides

Ils sont des molécules classées parmi les lipides complexes. Ils sont tous formés d'un acide phosphatidique qui renferme deux acides gras liés au carbone 1 et 2 du glycérol par des liaisons ester (ce qui forme la queue hydrophobe), et d'un acide phosphorique lié au carbone 3 avec le même type de liaison (ce qui représente le pôle hydrophile). D'autres molécules viennent se lier à l'acide phosphorique **le X montré sur la (Figure 18)** comme l'éthanolamine, la choline, la sérine l'inositol ou glycérol. A noter que le phosphatidyl- éthanolamine est le plus retrouvé dans les membranes bactériennes. Les phospholipides sont dits **amphipatiques** vu le caractère polaire est non polaire que présente chaque molécule (Singleton, P. & Dusart, J et al ;1999).

La composition lipidique des membranes cytoplasmiques bactériennes varie selon la température du milieu du sorte qu'elle reste toujours fluide, c'est à dire, les bactéries qui se développent à basse température possèdent plus d'acides gras insaturés dans les phospholipides (car il présente un faible point de fusion). A l'inverse, aux températures élevées, il y a plus d'acide gras saturés dans les phospholipides (Prescott et al., 2013).

A la différence des eucaryotes, les stérols (notamment le cholestérol) qui stabilisent la structure des membranes cytoplasmiques sont absents chez les procaryotes. Ce rôle est probablement assuré par des lipides appelées; **les hopanoïdes** tel que le bactériohopanetetrol (Stolz, J. F et al ;1993).

✚ Les protéines membranaires

Les protéines membranaires sont les molécules majoritaires de la membrane (60% à 70%). On distingue deux types de protéines membranaires à savoir; les **protéines périphériques** (20% à 30% des protéines totales) qui sont associées avec des liaisons faibles à la membrane avec un caractère polaire (solubles dans l'eau), et les **protéines transmembranaires** (intrinsèques) qui présentent un caractère amphipatique. En effet, les régions hydrophobes sont enfouies dans la bicouche lipidique alors que les régions hydrophiles s'associent pour former des canaux. Ces régions polaires peuvent être également exposées sur les deux surfaces de la membrane (interne et externe), sur lesquelles des glucides sont souvent griffés sur la surface extérieure (Figure 17) (Meyer, A et al, 2000). Les protéines membranaires sont essentiellement des enzymes et des transporteurs tels que les enzymes de la chaîne respiratoire, les enzymes impliquées dans la biosynthèse du peptidoglycane, les perméases...etc.

II .3 .2.2. Fonctions :

La membrane cytoplasmique sépare le cytoplasme de son environnement. Par conséquent, une déchirure de la membrane provoque une fuite du contenu cellulaire et ainsi la mort de la cellule. En plus de ce rôle protecteur, la membrane constitue une barrière perméable qui permet sélectivement l'entrée des nutriments, de l'eau et la sortie des déchets du métabolisme et beaucoup d'autres molécules. Donc, elle est responsable des échanges cellulaires grâce aux transports membranaires.

Le déplacement de l'eau à travers la membrane se fait par un phénomène physique appelé l'**osmose** par lequel l'eau se déplace du milieu moins concentré au milieu plus concentré. La molécule d'eau, vu sa petite taille, peut traverser la membrane bien que son passage soit facilité par des protéines spécifiques appelées aquaporines. Concernant les nutriments (sucres, acides aminés, sels, nucléotides, vitamines etc.), le passage des molécules s'effectue par deux types de transport à savoir; le transport passif et le transport actif (Borucki, Met al , 1995).

✚ **Le transport passif** s'effectue dans le même sens du gradient de concentration et ne nécessite pas d'énergie. Les modalités de transfert par le transport passif impliquent le phénomène de diffusion soit d'une façon directe à travers la bicouche lipidique si la molécule transportée est hydrophobe et non chargée, soit une diffusion facilitée par un transporteur membranaire de nature protéique (Figure 19).

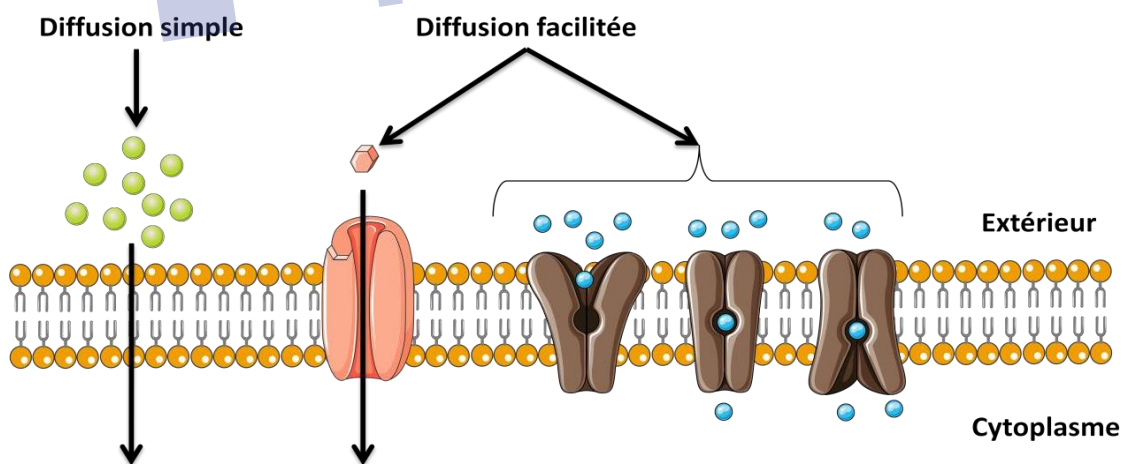


Figure 19: Les différents types de transport à travers la membrane plasmique.

✚ **Le transport actif** s'effectue contre le sens du gradient de concentration et nécessite de l'énergie. Les modalités de transfert par transport actif impliquent trois systèmes de transport. Le transport simple, la translocation de groupe et le système ABC. Le transporteur simple requiert uniquement une protéine transmembranaire, alors que la translocation de groupe implique une série de protéines lors du transport. Quant au système ABC, il implique une protéine liant le substrat, un transporteur et

une protéine hydrolysant l'ATP (**Figure 20**). L'ensemble de ces trois systèmes nécessite de l'énergie sous forme d'ATP, de force proton-motrice ou d'autres composés riches en énergie (**Madigane & Martinko, 2007; Prieur et al., 2011**).

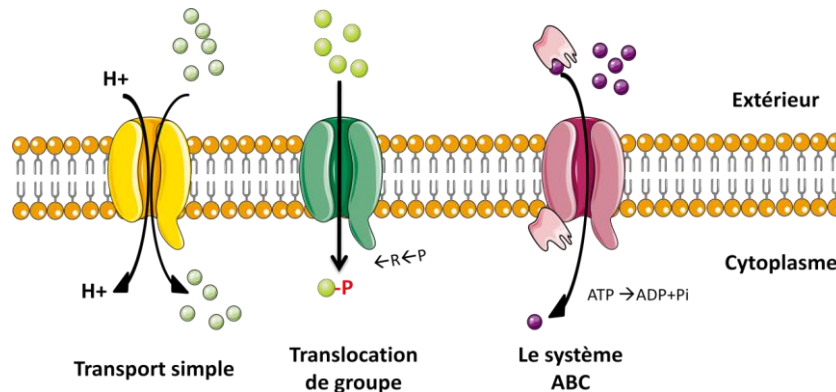


Figure 20: Les trois systèmes de transport membranaire

Ces trois systèmes font intervenir des transporteurs protéiques regroupés en trois classes (**Figure 21**) : les uniports transportent une seule molécule dans une seule direction. Les antiports assurent le transfert de deux molécules différentes dans deux sens inverses. Les symports transportent deux molécules au même temps dans le même sens (**Madigane & Martinko, 2007; Prieur et al., 2011**).

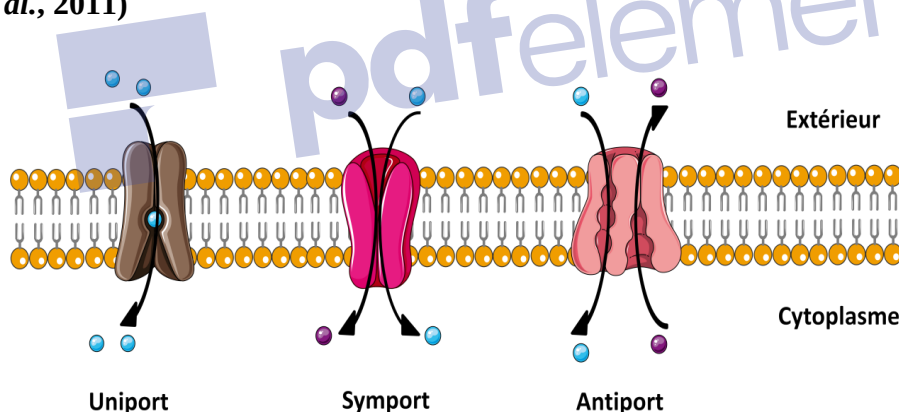


Figure 21 : Les trois classes de transporteurs membranaires.

Chez la bactérie *Escherichia coli*, le lactose est transporté selon le système du transport simple via une protéine symport appelée perméase lac qui transporte le lactose et l'ion H^+ simultanément dans le même sens contre le gradient de concentration. Dans le cas de la translocation de groupe, la molécule est chimiquement modifiée au cours du transfert. Par exemple, le transfert des sucres tels que le glucose chez *E. coli* implique cinq protéines qui transportent de groupement phosphate du phosphoénolpyruvate jusqu'au glucose (**Huebner, J et al ; 2006**).

Le système ABC (*ATP-binding cassette* ou cassette de liaison à l'ATP) est principalement retrouvé chez les bactéries à Gram négatif qui possèdent un espace périplasmique entre les deux

membranes (cytoplasmiques et externe). La protéine périplasmique se lie au substrat à transporter et traverse le transporteur transmembranaire puis, une autre protéine hydrolysant l'ATP en ADP et Pi fournit l'énergie de transport. Ce système est utilisé pour transporter certains sucres, des acides aminés, les phosphates, les sulfates ou les métaux lourds chez les bactéries à Gram négatif (Huebner, J et al ; 2006).

Les rôles de la membrane cytoplasmique bactérienne ne sont pas limités aux échanges cellulaires uniquement. En effet la membrane est impliquée dans la respiration cellulaire, dans la régulation de la division cellulaire et dans la réplication de l'ADN via le mesosome. De plus, la membrane est le lieu de fixation des flagelles et de l'initiation de leur mouvement. Par ailleurs, elle est la cible de certaines substances telles que les détergents et les antibiotiques (Huebner, J et al ; 2006).

NB : *Le mesosome* est une invagination de la membrane cytoplasmique de forme vésiculaire, tubulaire ou lamellaire. Cette structure est en étroite liaison avec le matériel nucléaire et joue un rôle dans la division cellulaire et la naissance du septum séparant les deux cellules filles.

II .3 .3. Le cytoplasme :

Le cytoplasme ou le cytosol est un élément constant présent chez toutes les bactéries. Il constitue un hydrogel fluide et aqueux caractérisé généralement d'un pH neutre (7,2). La membrane plasmique délimite ce cytoplasme dans lequel baignent les différents éléments cellulaires (ADN, ribosomes, inclusions, protéines, ions...etc.). Exceptionnellement, le cytoplasme de certaines espèces peut contenir d'autres structures particulières tels que des cristaux (chez *Bacillus thuringiensis*), des protéines "corps R" chez certaines bactéries parasites de protozoaires...etc. Dans cette partie (IV-3), les ribosomes ainsi que les substances de réserves (corps d'inclusion) seront décrits, (Dusart et al, 1999).

II .3 .3.1. Les ribosomes :

Les ribosomes sont de petites granulations sphériques de 10 à 30 nm de diamètre. Ils sont très abondants dans le cytoplasme des bactéries en croissance (plus de 15000 ribosomes/bactérie). De point de vue composition, les ribosomes sont constitués d'ARN (63%) et de protéines (37%) et la cohésion est maintenue en présence d'ions Mg^{++} et d'autres liaisons telles que les liaisons hydrogène, ioniques et hydrophobes (Singleton & Dusart, 1999). Vu la charge négative des ARN et de certaines protéines, les ribosomes fixent les colorants basiques tel que bleu de Méthylène. Deux sous unités composent le ribosome bactérien à savoir; une grande sous unité 50S

et une petite sous unité 30S. Cependant, ils présentent une constante de sédimentation de 70S (Attention! $50S + 30S \neq 80S$). La **(figure 22)** illustre la composition d'un ribosome procaryote (sous-unités, types d'ARNr, nombre de protéines) en comparaison à un ribosome eucaryote (**Dusart et al, 1999**).

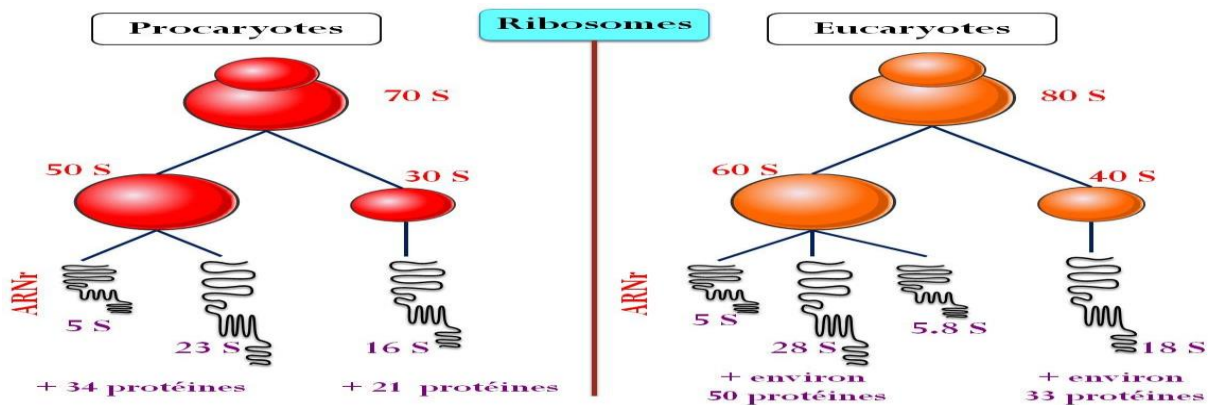


Figure22: Composition des ribosomes procaryotes vs ribosomes eucaryotes

✚ Rôle des ribosomes

Les ribosomes bactériens jouent un rôle fondamental dans la traduction de l'ARNMessager et la biosynthèse des protéines. Dans la plupart des cas, ils forment un polysome. La petite sous-unité 30S fixe l'ARNm en premier de son extrémité 5', puis la grande sous-unité se fixe en deuxième lieu sur la petite sous-unité pour mettre l'ARNm en "sandwich". La sous-unité 50S comporte deux sites; le site A (aminoacyl) qui accueille les ARNt et le site P (peptidyl) qui accueille la chaîne d'aminoacyl en cours de construction. Les acides aminés s'unissent les uns aux autres par des liaisons peptidiques pour former une protéine. La **(figure 23)** illustre le processus de biosynthèse des protéines par le ribosome bactérien (**seWoe,et al.,1997**).

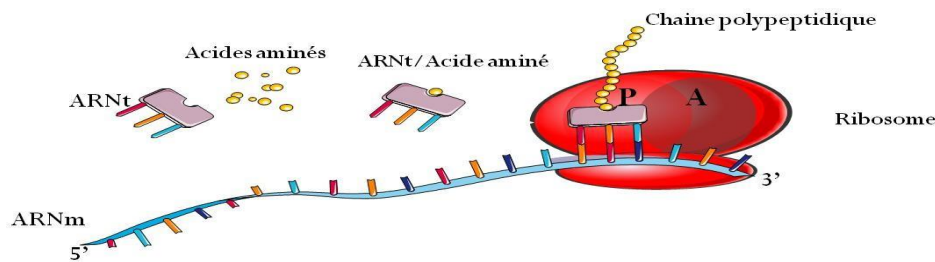


Figure 23: Processus de biosynthèse des protéines par les ribosomes bactériens.

NB : Plusieurs antibiotiques perturbent le fonctionnement des ribosomes tels que les Aminosides, les phénicolés, les tetracyclines, l'acide fusidique, l'oxasolidinole, la rifamycine.

II .3.3.2. Les corps d'inclusion et les substances de réserve :

Certaines bactéries accumulent au cours de leur croissance des produits de réserve qui forment des granulations, parfois visibles au microscope. Généralement, ces dépôts forment des granules en contact direct avec le cytoplasme, elles ne sont pas limités par une membrane sauf les granules de fer des magnétosomes (Stolz et al,1993). Les principales substances de réserve retrouvées sont :

- 1- **Le glycogène** (ou l'amidon, moins fréquent): Ce type de réserve est fréquent chez les entérobactéries, les *Clostridium...etc*(Stolz et al,1993)..
- 2- **β -hydroxybutyrate:** C'est un composé qui est utilisé pendant la maturation de la spore. On le rencontre donc en particulier chez les bactéries sporulantes comme *Bacillus megaterium*. Il peut être mis en évidence par des colorants spécifiques des graisses comme le noir Soudan(Stolz et al,1993).
- 3- **Polyphosphates inorganiques:** Ce sont des polymères linéaires d'orthophosphate. Ils constituent les granulations métachromatiques qui prennent une coloration pourpre en présence de colorants basiques comme le bleu de toluidine (présents chez les corynébactéries) (Stolz et al,1993).
- 4- **Fer et soufre :** Les inclusions de Fer se trouvent chez les sidérobactéries: Le fer peut être sous forme d'hydroxyde de fer ou d'oxyde de fer (bactéries magnétiques pouvant être déplacées dans un champ magnétique). Quant aux inclusions de soufre, elles sont présentes chez les thiobactéries qui tirent leur énergie de l'oxydation de H_2S (Stolz,1993).
- 5- **Chromatophores et pigments:** Le chromatophore des bactéries photosynthétiques joue le rôle

de chloroplaste des plantes supérieures. Ils contiennent des pigments photosynthétiques appelés bactériochlorophylles qui assurent la conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique(Stolz et al,1993).

6- **Vacuoles à gaz** : Elles sont rencontrées chez les procaryotes photosynthétiques: bactéries pourpres, bactéries vertes, algues bleu-vert. Elles permettent à ces micro-organismes aquatiques de flotter et de remonter à la surface de l'eau(Stolz et al,1993).

II .3 .3.3. Le chromosome :

Le chromosome bactérien est un ADN diffus dans le cytoplasme (non entouré par une membrane nucléaire). Il forme un filament unique d'ADN: circulaire, surenroulé, bicaténaire ayant une taille parfois 1000 fois plus long que la bactérie (ex *E. coli* : $1360\ \mu\text{m} = 1,36\ \text{mm}$) et un poids moléculaire d'environ $\text{PM} = 3 \times 10^9$ Daltons pour les bactéries à tailles standards. La condensation et le dépliement de l'ADN bactérien se fait par des protéines spécifiques appelées les topoisomérases I et II respectivement (Figure24) (other authors et al ; 2000) .

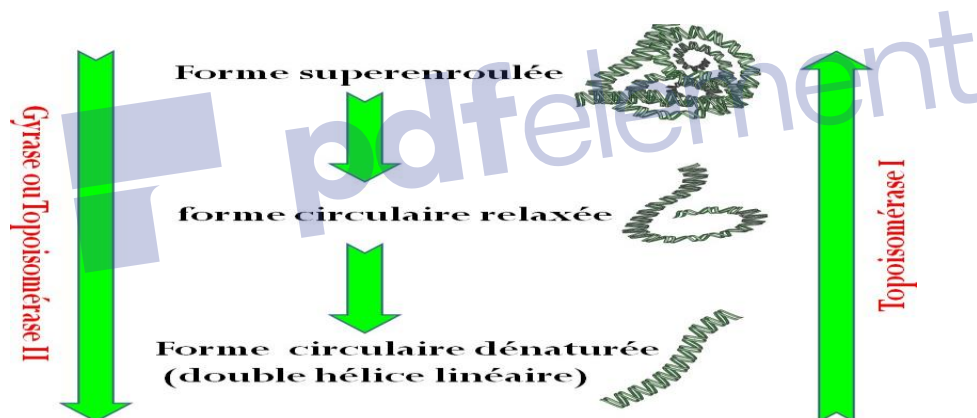


Figure 24 : Le changement de conformation de l'ADN bactérien

+ Mise en évidence

L'ADN bactérien peut être mis en évidence par des méthodes cytochimiques en utilisant la réaction de Feulgen de la méthode de Stille et Piekarski (Bactéries + acide chlorhydrique dilué + réactif de Schiff) ou à l'aide de colorants basiques tels que le bleu de méthylène, la fuschine basique...etc(other authors et al ; 2000).

✚ Morphologie

La morphologie de l'ADN bactérien diffère d'une bactérie à une autre en fonction de la phase de croissance du stade de la division bactérienne. Chez les formes cocci, il paraît une petite masse sphérique, alors que chez les formes bacilles, il paraît diffus dans le cytoplasme(**other authors. 2000**).

✚ Composition et structure

L'ADN= Acide Désoxyribo Nucléique est composé de deux chaînes complémentaires antiparallèles formée chacune d'un ensemble de nucléotides liés par des liaisons diester. Un Nucléotide est composé d'un phosphate, d'un sucre pentose (désoxyribose) et d'une base purique (A ou G) ou pyrimidique (C, T). La structure des chaînes de nucléotides est stabilisée grâce à des liaisons d'hydrogènes (A avec T et G avec C) pour engendrer une structure en double hélice (**Figure25**). Le nombre et l'ordre des nucléotides (CTP, GTP, ATP et TTP) déterminent une séquence d'un gène particulier. Le rapport de $A+T / C+G = GC\%$ appelé le coefficient de Chargea. Ce rapport GC% varie selon les espèces mais reste constant chez les souches d'une même espèce (ex: 50% chez *Escherichia coli*, 30 à 40 % chez *Protes*, 25 à 45 % chez les *Clostridie*, 60 à 70% chez les *Pseudomonas*) (**other authors et al 2000**).

NB : Chez les eucaryotes: l'ADN est couplé à des protéines basiques (histones) tandis que chez les procaryotes, l'ADN est neutralisé par d'autres protéines basiques qui jouent un rôle dans la stabilisation de la structure condensée de l'ADN.

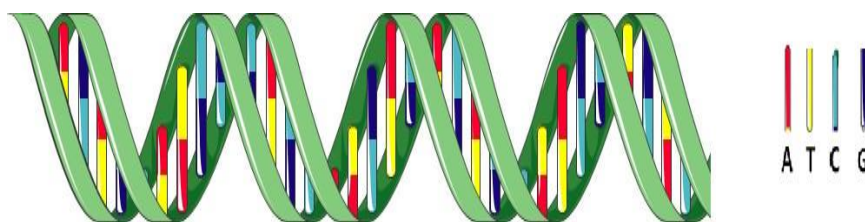


Figure25: La structure en double hélice de l'ADN.

✚ Réplication

La réplication de l'ADN bactérien se fait selon le mode semi-conservatif (**Figure26**). La réplication se déclenche au niveau de l'origine de réplication et passe par trois phases. Tout d'abord, l'étape d'initiation qui se traduit par la reconnaissance de la séquence de l'origine de réplication, la formation du primosome, l'ouverture du double brin et stabilisation des brins, l'accrochage de l'ADN polymérase et la synthèse d'une amorce ARN par la primase. Par la suite, il ya la phase de l'élongation de la réplication et enfin la phase de la terminaison en utilisant des facteurs protéiques spécifiques appelés respectivement, les facteurs d'élongation et les facteurs de terminaison telle que la protéine Tus (*Terminator Utulilisation Substance*) (**other authors et al ; 2000**).

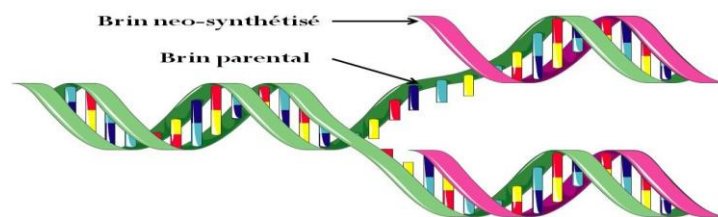


Figure 26 : Le mode semi-conservatif de la réplication d'ADN.

✚ Rôle

Le chromosome bactérien est le vecteur des caractères héréditaires. Toute protéine synthétisée qui passe par la voie ribosomale est codée par un gène au niveau de l'ADN. Ce dernier est transcrit en ARNm et traduit en protéine par les ribosomes (**Figure27**) (**other authors et al ;2000**).

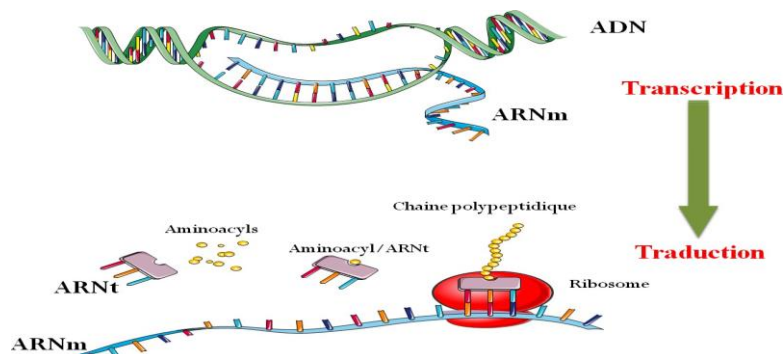


Figure 27: Rôle de l'ADN dans l'expression des caractères héréditaires.

II .3 .4. Les plasmides :

+ Structure et réplication

Le plasmide bactérien est une molécule d'ADN bicaténaire et circulaire et de petite taille (5 à 4000 fois plus petit que le chromosome). Il adopte un enroulement serré (torsadé) afin de préserver l'espace cellulaire. Grâce à son origine de réplication, le plasmide se réplique d'une manière autonome. Par ailleurs, il n'est pas indispensable au métabolisme central de la cellule bactérienne. A noter qu'une bactérie peut posséder plusieurs plasmides différents (s'ils sont compatibles) ou également plusieurs copies d'un même plasmide. Les plasmides bactériens peuvent porter des gènes de résistances aux antibiotiques, de métabolismes ...etc. (voir le titre : propriétés des plasmides) (Schulz, H ;et al.,1999).

NB : Incompatibilité plasmidique signifie la non-possibilité pour deux plasmides de nature différente de coexister dans la même cellule

La réplication des plasmides bactériens est similaire à celle du chromosome. Par un mécanisme précis la réplication, le nombre de copies, la répartition équitable dans les cellules filles sont contrôlés.

+ Transfert plasmidique

Les plasmides participent aux transferts horizontaux de gènes entre les populations bactériennes, et donc à la dissémination des gènes conférant des avantages sélectifs (par exemple des résistances aux antibiotiques ou des facteurs de virulence). Le transfert des plasmides d'une bactérie donneuse à une bactérie receveuse peut se faire par plusieurs modes de transfert telles que la conjugaison bactérienne (via un pili sexuel), la transduction (via un bactériophage), la mobilisation, la transformation (absorption d'un ADN nu) ou la transposition. La (figure 28) illustre les transferts par conjugaison, transduction et transformation (Schulz, H ;et al.,1999).

+ Transfert par conjugaison et mobilisation

La conjugaison est le mode de transfert plasmidique le plus retrouvé chez des bacilles à Gram négatif. Il existe deux types de plasmide à savoir des plasmides conjuguatifs et des plasmides non conjuguatifs (Schulz, H ;et al.,1999).

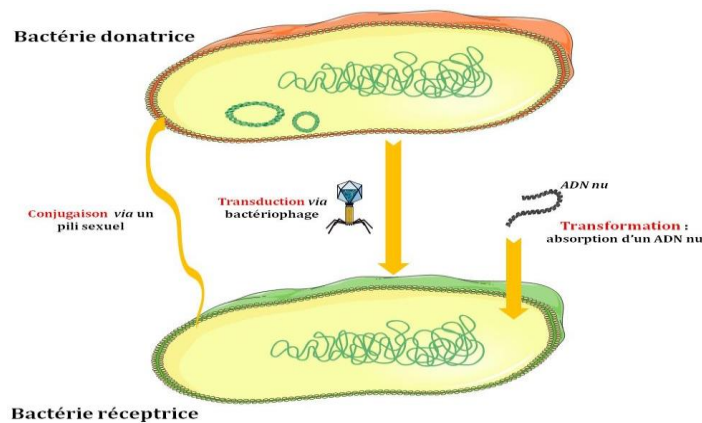


Figure 28 : Modes de transfert plasmidique (conjugaison, transduction et transformation).

Les plasmides conjuguatifs sont généralement d'une taille supérieure à 30 mégadalton et d'un faible nombre de copies. Ce type de plasmide induit la synthèse de pili sexuel responsable de son transfert dans la cellule hôte.

Les plasmides non conjuguatifs sont présents en nombre élevé par cellule et leur transfert se fait par une mobilisation via un plasmide conjuguatif (Schulz, H ;et al.,1999).

✚ Transfert par transduction

La transduction concerne les bactéries proches phylogénétiquement et le transfert des plasmides (ou d'autres gènes) se fait par l'intermédiaire d'un bactériophage. Ce mode de transfert est souvent utilisé pour le transfert des caractères de résistance aux antibiotiques chez les genres *Staphylococcus* et *Streptococcus* (Schulz, H ;et al.,1999).

✚ Transfert par transformation

La transformation est le transfert de gènes par résultant de l'absorption d'ADN nu. Certains genres bactériens comme *Bacillus*, *Haemophilus*, *Neisseria*, *Pneumococcus* peuvent absorber de l'ADN à partir de l'environnement, et l'ADN absorbé peut être incorporé dans le chromosome ou dans le plasmide de la bactérie receveuse. Cependant, la transformation est affectée par certains facteurs comme la taille de l'ADN transformé et la compétence du receveur. De plus, la transformation est sensible aux nucléases de l'environnement. Concernant l'ADN transformé, l'ADN double brin se transforme mieux que l'ADN simple brin et plus la taille d'ADN est petite mieux est la transformation. Quant à la compétence du receveur, certaines bactéries sont capables d'absorber de l'ADN naturellement à un moment précis de leur cycle de croissance. Elles produisent une protéine spécifique appelée facteur de compétence (Schulz, H ;et al.,1999).

NB : La compétence peut être induite in vitro par traitement chimique (ex : CaCl_2) car la

transformation est beaucoup utilisée dans le transfert des plasmides construits par génie génétique pour des utilisations biotechnologiques (expression de protéine recombinante, clonage de gène...etc.). Les plasmides sont transformés dans des cellules rendues compétentes (électrocompétentes ou thermocompétentes) et sont souvent modifiés pour être présents à un nombre de copies beaucoup plus élevé, de l'ordre quelques dizaines à quelques centaines, ce qui permet une amplification de la production d'ADN et/ou de protéines.

La transformation passe par deux étapes, la première étant l'absorption de l'ADN soit sous forme double brin chez les bactéries à Gram⁻ ou en simple brin chez les bactéries à Gram⁺ (le brin complémentaire est synthétisé chez le receveur), et la deuxième est la recombinaison homologe. Cette recombinaison nécessite une homologie entre l'ADN donneur et du receveur (Schulz, H ;et al.,1999) .

✚ Transfert par transposition

La transposition est l'intégration directe d'une séquence de gènes (de taille limitée) au sein d'un ADN (chromosomique ou plasmidique). Un transposon est limité par des séquences répétitives inversées (IR) appartenant à des séquences d'insertion (IS). Les IS portent les gènes nécessaires à la transposition (transposase, l'intégrase, éléments régulateurs de la transposition) tandis que le fragment central porte les marqueurs spécifiques comme la résistance aux antibiotiques.

La **figure29** représente le transposon de la résistance à la vancomycine chez le genre *Enterococcus* (Schulz, H ;et al.,1999).

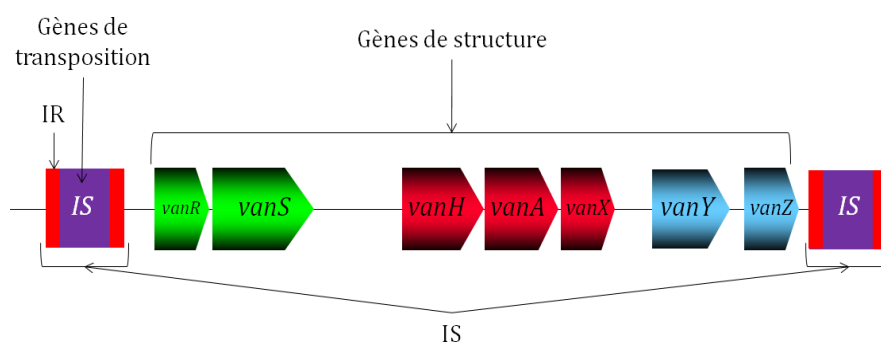


Figure 29 : Le transposon de la résistance à la vancomycine chez le genre *Enterococcus*.

✚ Propriétés

Les gènes portés par les plasmides peuvent coder des protéines d'intérêts biologiques divers telles que résistance aux antibiotiques (bêta-lactamines, aminosides, phénicol, cyclines, macrolides); la résistance aux antiseptiques mercuriels et aux métaux lourds, la résistance aux

bactériophages. D'autres gènes sont responsables de la virulence et ce, par la synthèse de bactériocines qui inhibent la croissance d'autres bactéries (ex. : colicines d'*Escherichia coli* létales pour les entérobactéries). Des gènes à intérêt métaboliques peuvent également être plasmidiques tels que l'opéron lactose chez les *Proteus*, la production de H₂S chez *E.coli*, la dégradation du toluène ou de l'octane chez les *Pseudomonas*...etc. Par ailleurs, des gènes qui assurent la réplication autonome sont présents sur tous les plasmides ainsi que des gènes qui assurent leur transfert par conjugaison chez les plasmides conjugatifs (Schulz, H ;et al.,1999).

II .3.5. Les Pilis :

Les Pilis ou fimbriae sont de courts appendices protéiques fins et plus minces que les flagelles qui mesurent de 3 à 10 nm de diamètre et plusieurs µm de long. On les retrouve plus fréquemment chez les bactéries à Gram négatif que celles à Gram positif. Contrairement aux flagelles, les pilis ne sont pas impliqués dans le mouvement. Il existe deux types de pili à savoir ; les pilis communs et les pilis sexuels. Les deux types sont composés des protéines appelées pilines (adhésine). Les sous unités de la piline sont séparées par chauffage ou traitement acide et reformées à froid ou à pH neutre (Payan, C.et al., 2011)

✚ Pilis communs

Le nombre de pilis communs varie de 2 jusqu'à 1000 fimbriae par bactérie et jouent un rôle d'adhésion et de pathogénicité en protégeant la bactérie contre la phagocytose (ex : gonocoque, *Salmonella*) (Payan, C.et al., 2011).

✚ Pilis sexuels

A l'inverse des pilis communs, les pilis sexuels sont plus longs, plus épais et moins nombreux (de 1 à 5 pilis par bactéries) et se terminent par un renflement. Les pilis sexuels permettent le contact et l'accouplement entre deux bactéries par le phénomène de conjugaison.

NB : Les streptocoques et staphylocoques (Gram +), possèdent une couche externe de protéines filamenteuses (Protéines M et A respectivement) qui jouent le rôle d'antigène de surface et d'adhésion au tissu de l'hôte (Payan, C.et al., 2011).

II .3.6. La capsule :

La capsule est une structure inconstante organisée qui forme une couche visqueuse, localisée à l'extérieur de la paroi cellulaire. Cette couche ne peut pas être facilement enlevée de la cellule. Au laboratoire plusieurs méthodes permettent sa mise en évidence telles que la méthode à l'encre de Chine, la technique au cristal violet et au sulfate de cuivre, la technique de BORREL (bleu de

Borrel) ou la technique immunochimique (phénomène de Neufeld) utilisant des anticorps anti-capsulaires qui induisent un gonflement capsulaire (Ex : pneumocoques) (**Payan, C.et al., 2011**).

NB : Une capsule peut entourer un ou plusieurs corps bactériens

Composition et morphologie

Les constituants capsulaires sont le plus souvent de nature polysaccharidiques (Ex : *Streptococcus pneumoniae*) ou parfois polypeptidiques (Ex : *Bacillus anthracis*) Les capsules « vraies » sont celles qui entourent la paroi comme les capsules de *Streptococcus pneumoniae*. Cependant, d'autres couches comme les couches « diffuses » les couches « slime » (biofilm) peuvent former une capsule (ex : *Staphylococcus epidermidis*) La couche muqueuse ou slime est une couche diffuse, facilement séparable du corps bactérien Certains polysides produits par des bactéries ont un intérêt industriel comme *Leuconostoc mesenteroides* qui produit des dextrans.

Le glycocalyx peut comprendre à la fois les capsules et les couches mucoïdes. Il constitue un réseau de polysaccharides recouvrant la surface des bactéries et d'autres cellules voisines. La couche S est constituée de sous unités protéiques organisées de façon cristalline selon un système géométrique carré, hexagonal ou oblique. Cette couche est fréquente chez les archéobactéries mais aussi chez les bactéries (*Chlamydia*, *Treponema*, *Helicobacter*, *Bacillus*, *Clostridium* ...etc.) (**Payan, C.et al., 2011**).

Fonctions

La capsule ne joue pas un rôle vital pour la bactérie mais elle peut être utile à la bactérie grâce à ses rôles. En effet, la capsule protège la bactérie contre les agents physiques et chimiques, la dessiccation, les UV et la fixation des bactériophages. De plus, elle joue un rôle dans le pouvoir pathogène car elle exerce un chimiotactisme négatif sur les leucocytes, elle s'oppose à la phagocytose en diminuant l'adhésion des bactéries aux macrophages et elle empêche la pénétration des antibiotiques.

La capsule est considéré comme un facteur de virulence donc sa présence dans certaines bactéries les rendent virulentes (*Streptococcus pneumoniae*). Les capsules jouent également un rôle antigénique et les antigènes capsulaires (Antigène K : Kapsel) sont responsables de la spécificité sérologique (Ex : l'antigène Vi chez *Salmonella Typhi*). Quant à la couche S, elle joue un rôle de squelette, d'adhésion, de résistance aux protéases des macrophages et de protection vis à vis des bactériophages (**Payan, C.et al., 2011**).

II .3 .7. Les cils et les flagelles :

Les cils et les flagelles sont des appendices locomoteurs rigides et fins de nature protéique (composés de flagelline) avec une structure hélicoïdale qui s'étendent de la membrane plasmique jusqu'à l'extérieur en traversant la paroi bactérienne. Ces structures qui caractérisent les bactéries mobiles dont le diamètre est d'environ 10 à 25 nm (ex: 12 nm chez *Proteus* et de 20 -25 chez *Pseudomonas*)(**Angert, E. R.,et al.,1993**).

Mise en évidence :

Les cils et les flagelles sont des structures très fines pour être visibles au microscope optique. Au laboratoire, ils sont mis en évidence par la méthode de Rhodes qui consiste à appliquer le mordant de Rhodes pour 3mn sur un frottis de bactéries flagellées auquel les nitrates d'argent ammoniacal sont rajoutées. Après chauffage jusqu'à ébullition le frottis est laissé 3 à 5 minutes en contact avec le mélange)(**Angert, E. R.,et al.,1993**).

Cette méthode très délicate permet de rendre la structure des flagelles plus épaisse et donc visible au microscope (**Angert, E. R.,et al.,1993**).

Structure et dispositio :

La microscopie électronique à transmission a permis de montrer que le flagelle bactérien est composé de trois parties à savoir; le corps basal enfoui dans la membrane cytoplasmique, le filament qui s'étend à l'extérieur de la cellule et enfin, le crochet qui relie le corps basal au filament (**Figure30**). De point de vu structural, le filament est composé de sous- unités de flagelline dont la masse molaire vari de 30000 à 60000 Da selon l'espèce bactérienne. Cette protéine s'organise pour créer un filament long creux et rigide. Le filament de certaines espèces est entouré également par une gaine de lipopolysaccharides telle que *Vibrio cholerae*. Le crochet et le corps basal sont plus larges est plus complexes que le filament. Le corps basal est ancré dans la membrane cytoplasmique et il est composé de disques (anneaux). Chez les bactéries à Gram négatifs, plusieurs disques sont retrouvés (C, MS, P et L) alors que les bactéries à Gram positif, deux anneaux uniquement sont présents (**Prescott et al., 2013**).

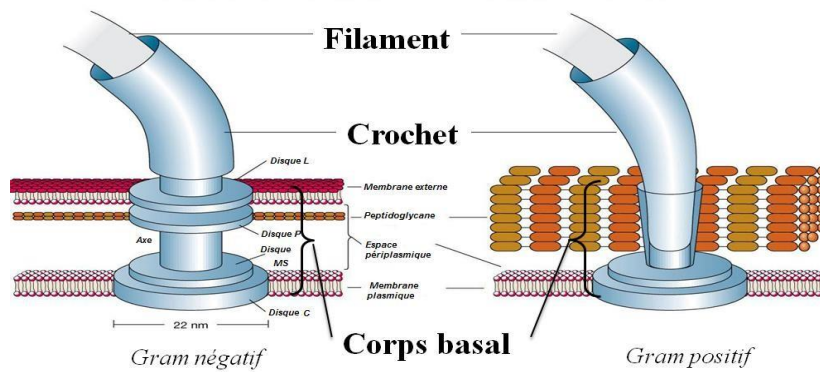


Figure 30: L'ultrastructure d'un flagelle de bactéries
à Gram négatif (à gauche) et à Gram positif (à droite)

Le mode de distribution des flagelles bactériens varie d'une espèce à une autre. Le tableau suivant résume l'arrangement des flagelles les plus retrouvés chez les bactéries à savoir, la flagellation monotriches, lophotriche, amphitriche et péritriches (Angert, E. R., et al., 1993).

Tableau 5 : Arrangement des flagelles chez les bactéries

Type de flagellation	Représentation	Exemple de bactéries
Monotriche Une seule ciliature polaire		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Aeromonas sp</i> <i>Vibrio sp</i>
Lophotriche Une touffe de flagelles polaires		<i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Spirillum sp</i>
Amphitriche Des ciliatures dans les deux extrémités (soit un seul ou plusieurs flagelles)		<i>Helicobacter sp</i> <i>Plesiomonas shigelloides</i>
Péritriche Flagelles distribués sur toute la surface de la bactérie		<i>Proteus vulgaris</i>

Fonctions

Le rôle principal des flagelles est la mobilité. Les flagelles fonctionnent comme les hélices de bateaux, par conséquent, une rotation dans le sens opposé à celui des aiguilles d'une montre engendre un déplacement avant appelé la course. À l'inverse, une rotation dans le sens des aiguilles d'une montre engendre une culbute (elle se tourne sur elle-même afin de changer de sens). La mobilité permet aux bactéries d'envahir les tissus de l'hôte ce qui permet de considérer les flagelles comme des facteurs de virulence. Les flagelles possèdent d'autres rôles autres que la mobilité tel que le chimiotactisme. Le système du chimiotactisme permet à la bactérie de sentir le milieu environnemental (attractif ou répulsif) et provoque une réponse par un changement de rotation des flagelles. Dans le cas des nutriments (substance attractive), les bactéries métabolisent les nutriments dans le voisinage immédiat, créant un gradient chimique. Elles vont ensuite se déplacer suivant le gradient pour former un anneau de croissance. Enfin, un rôle antigénique est attribué aux flagelles grâce aux flagellines qui sont antigéniques (antigène H) ce qui donne une agglutination en présence d'anticorps correspondants. En clinique, ce rôle est exploité notamment dans le sérodiagnostic de la fièvre typhoïde (**Angert, E. R., et al., 1993**).

II .3 .8. Les endospores bactériennes :

La grande majorité des bactéries se multiplie exponentiellement tant que la nourriture est à leur disposition, puis entrent en phase stationnaire quand les ressources sont épuisées, et enfin finissent par se lyser et mourir. Il existe cependant quelques espèces capables de se différencier en une cellule plus résistante au moment où leur croissance n'est plus possible. Ce phénomène est appelé la sporulation. La sporulation caractérise plusieurs genres de bactéries à Gram positif fréquemment ayant le sol comme habitat naturel (**Borucki, Met al. ; 1995**).

Parmi ces bactéries, les trois genres; *Bacillus* (forme bâtonnet), *Clostridium* (forme bâtonnet) et *Sporosarcina* (forme coque) sont principalement étudiés. Ces bactéries sporulées sont capables de former des structures en petites unités ovales ou sphériques appelées spores ou endospore (endo : intérieur, car leur formation est intracellulaire) (**Borucki, Met al. ; 1995**). La plupart des bactéries capables de se sporuler sont impliquées dans la pathologie infectieuse par la production de toxines. Parmi ces pathologies, la gangrène gazeuse causée par *Clostridium perfringens*, le botulisme causé par *Clostridium botulinum*, le tétanos causé par *Clostridium tetani* et la maladie du charbon ou anthrax causée par *Bacillus anthracis*. Cette dernière a été utilisée dans le terrorisme biologique aux Etats Unis. Après les attentats du 11 septembre 2001, des attaques à l'aide d'enveloppes contaminées par *Bacillus anthracis* se sont enchaînées (**Borucki, Met al. ; 1995**).



Mise en évidence

Les endospores bactériennes apparaissent comme des corps réfringents au microscope optique. Etant imperméables à la plupart des colorants tel que le bleu de méthylène, les endospores apparaissent comme des zones incolores. Donc, afin de les colorer, des techniques spécifiques sont nécessaires comme la méthode de Benito-Trujillo.

Cette dernière est une coloration différentielle qui consiste à appliquer deux colorants à savoir; le vert de malachite et la fuchsine ou la safranine. Sur un frottis préparé, le vert de malachite est utilisé en premier lieu en chauffant jusqu'à émission de vapeur et en laissant pendant 3 à 6 min puis la safranine (ou la fuchsine) en deuxième lieu (Borucki, Met al. ; 1995).

A l'observation, les endospores apparaissent en vert et le corps bactérien apparaît en rose (Figure 31).



Figure 31 : Résultats d'une coloration de Benito-Trujillo effectuée sur *Bacillus subtilis*. 1: corps bacillaire, 2 : endospore sub-terminale, 3: spore mature libre en dehors du corps bactérien.



Morphologie

La forme et notamment la position de la spore sont recherchées dans un but taxonomique. En effet, elle peut être de forme sphérique, cylindrique ou ovoïde en position centrale, sub-terminale ou terminale. De plus, la spore peut déformer la structure du corps bactérien. La (figure 32) illustre les différentes formes et positions de la spore bactérienne (Borucki, Met al. ; 1995).

Forme de la spore	 Sphérique	 Cylindrique	 Ovoïde
Position de la spore	 Centrale	 Sub-terminale	 Terminale
Déformation de la spore	 Non déformante	 Déformante	

Figure 32 : Les différentes morphologies de l'endospore bactérienne

Structure

La structure des endospores bactériennes est très différente de celle de la cellule végétative. En effet, l'endospore présente plusieurs enveloppes inexistantes dans la forme végétative. De l'intérieur à l'extérieur, la spore est composée d'un ADN bactérien (Nucléoïde) entouré par une membrane plasmique et une paroi sporale. Ce noyau appelé noyau protoplastique est entouré par d'autres enveloppes à savoir; un cortex, des tunique (internes et externes) et l'exosporium (**Figure 33**) (**Borucki, Met al. ; 1995**).

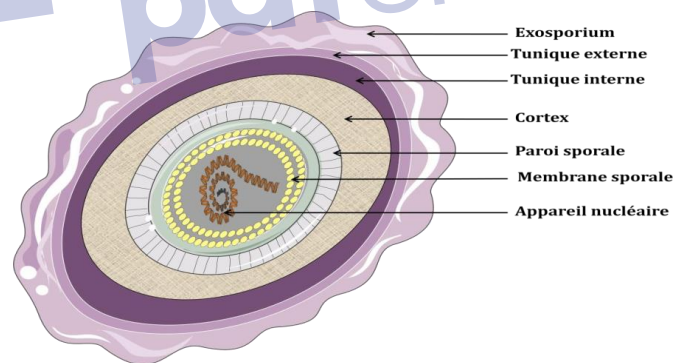


Figure 33 : La structure d'une endospore bactérienne

L'exosporium est une couche fine de lipoprotéines contenant 20% de sucres (**Meyer et al., 2000**). Il n'est pas essentiel à la vie de la spore. Les tunique (internes et externes) sont composées de protéines de type kératine très riches en ponts disulfure donnant la caractéristique d'imperméabilité aux agents chimiques. Le cortex peut occuper plus de la moitié de la spore, c'est une couche épaisse d'un aspect monomorphe composé de peptidoglycane inhabituel moins ponté et plus sensibles au lysozyme. Le noyau protoplastique possède les structures cellulaires normales tels que la paroi sporale, la membrane cytoplasmique, les ribosomes et le nucléoïde. Cependant, le

protoplaste contient une très faible quantité d'eau et donc inerte de point de vue métabolique.

La paroi sporale est formée d'un peptidoglycane habituel ce qui devient la paroi de la cellule végétative après germination. En plus de ces constituants, le noyau protoplastique contient une quantité importante de l'acide dipicolinique. Ce dernier retrouvé sous forme de complexe calcique (dipicolinate de calcium), est présent chez toutes les endospores bactériennes et représente environ 10% du poids de la spore. De plus, il joue un rôle important dans la réduction de la biodisponibilité de l'eau, favorisant ainsi la déshydratation de la spore et s'intercale également entre les bases d'ADN empêchant sa dénaturation par la chaleur (**Madigane & Martinko et al, 2007**).

✚ Phénomène de sporulation

Le phénomène de sporulation désigne le passage de la cellule de la forme végétative à la forme sporale (spore). Ce phénomène ne se déroule pas lors de la phase exponentielle de croissance ou les nutriments sont disponibles, il se déclenche lorsque les conditions deviennent défavorables pour la croissance. Ces dernières peuvent être occasionnées par un manque de nutriments (notamment le carbone ou l'azote), manque d'eau, température de croissance défavorable, pression élevée, pH défavorable...etc. La sporulation est alors une stratégie de survie face aux conditions létales. La spore peut revenir à la forme végétative dès le retour des conditions défavorables formant ainsi un cycle (**Borucki, Met al. ; 1995**). Ce chemin inverse est appelé germination (**Figure 34**).

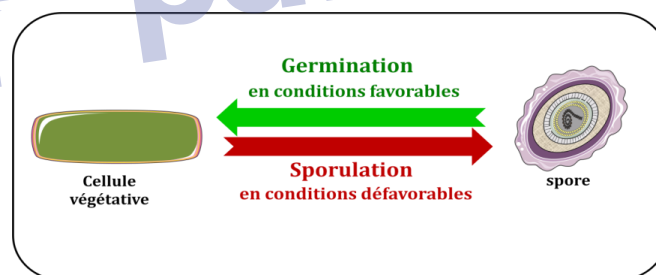


Figure 34 : Le cycle sporal; passage de la forme végétative à la forme sporale et vice-versa

La sporulation passe par plusieurs étapes et fait appel à une série d'évènements de différenciation cellulaire sous une régulation génétique complexe. Elle dure huit (8) heures chez *Bacillus subtilis* (**Madigane & Martinko et al, 2007**). En réponse à des modifications environnementales (conditions défavorables), la cellule stoppe la synthèse des ARN et des protéines de la forme végétative. Après sa réplication, l'ADN se dispose en filament chromatique axial, et la cellule déclenche alors une division asymétrique en installant septum transversal subpolaire qui finit par la formation d'une zone autonome: Cette zone contenant l'appareil nucléaire, le cytoplasme et une double membrane continue (externe et interne) est appelée la préspore. Par la suite, la spore s'entoure d'un certain nombre de téguments ou enveloppes qui mûrissent progressivement. Après

maturation, il ya formation d'une double membrane sporale et synthèse des nouvelles couches à savoir; la paroi sporale, le cortex qui se forment entre la face interne de la double membrane, les tuniques et l'exosporium qui se disposent à l'extérieur. Souvent, après maturation, la spore mature se libère et l'autre partie du corps bactérien est lysée (**Madigane & Martinko, 2007; Meyer et al., 2000; Prescott et al., 2013**).

Propriétés de la spore bactérienne

La spore bactérienne est une forme extraordinairement résistante qui peut persister dans le temps des millions d'années! Des spores bactériennes de l'ère dominicain de 25 à 40 millions d'années ont pu être identifiées et revivifiées (**Cano & Borucki et al, 1995**). Plus spectaculaire, des bactéries halophiles piégées dans des cristaux de sels datant de 250 millions d'année (l'ère permien) (**Vreeland et al., 2000**)

Grace à leurs compositions, les endospores sont capables de résister à des températures extrêmes. Généralement la spore survie à des températures de 70 °C à 80 °C durant 10 minutes. Certains bactéries comme *Plectridium caloritolerans* résistent plus de 8h à 100°C et 5 minutes à 120°C (**Meyer et al., 2000**) .

La thermorésistance des spores pose un problème de stérilisation dans les hôpitaux (salles de chirurgie) ainsi que dans les industries alimentaires (stérilisation des aliments en conserve). La thermorésistance des spores est en rapport direct avec le dipicolinate de calcium et, à un degré moins, à l'acide L-N-succinyl-glutamique. La déshydratation (moins de 20% d'eau dans une spore vs 80% d'eau dans une cellule végétative) joue également un rôle important dans la thermorésistance. C'est bien connu que des structures comme de l'ADN ou des protéines résistent plus à la dénaturation par chaleur à leur état anhydre (**Meyer et al., 2000**).

La composition de la spore lui permet de résister aux agents physico-chimiques tels que les radiations (UV, rayons X), la pression, les antiseptiques, les désinfectants, les antibiotiques...etc. De plus, vu le métabolisme inerte des spores, elles supportent des déshydratations poussées, des carences en éléments nutritifs, vieillissement, manque d'oxygène ce qui fait de ces structures les formes les plus résistantes du domaine des *Bacteria*.

L'une des propriétés la plus importante des spores bactérienne est qu'elles sont capables de reprendre la forme végétative dès le retour des conditions favorables par le phénomène de la germination.

Germination

Le processus de germination (**Figure 35**) qui permet la transformation d'une spore en une cellule végétative (retour de la dormance à la vie active) se fait en trois stades; l'activation, germination (ou initiation) et l'émergence (éclosion ou excroissance) (**Madigane & Martinko, 2007; Meyer et al., 2000**).

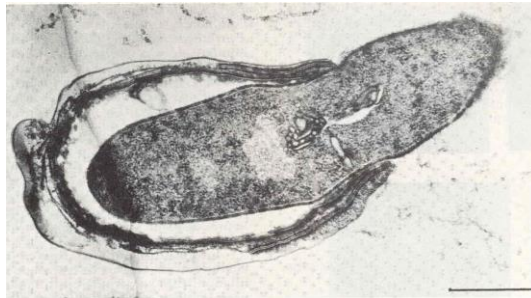


Figure 35: La germination d'une endospore (Prescott et al., 2013)

L'étape de l'activation correspond à une lésion des enveloppes sporales par des agents physiques (choc thermique), mécaniques (abrasion, choc) ou chimiques (acides, lysozyme...). L'activation est provoquée en industrie alimentaire par le procédé de la tyndallisation qui consiste à chauffer un produit, contenant éventuellement des spores bactériennes, à une température de 65 °C à 95 °C ce qui permettra l'activation et la germination des spores (NB :un deuxième traitement thermique est nécessaire pour éliminer les formes végétatives issues de la germination)(**Meyer et al., 2000**).

Après l'activation des spores, l'étape de la germination débute en présence de conditions favorables telle que l'hydratation et les métabolites effecteurs (Alanine, Mg, adénosine...) qui pénètrent à travers les enveloppes endommagées. Puis des enzymes hydrolytiques dégradent les constituants de la spore en libérant le dipicolinate de calcium ce qui permet à la spore de s'imbiber d'eau et de gonfler(**Meyer et al., 2000**).

Enfin, l'émergence de la cellule végétative en dégradant le cortex et téguments externes et la cellule entame une phase active de biosynthèse et de reprise

graduelle de la croissance végétative. La paroi sporale devient la paroi bactérienne et la cellule double son volume initiale et se libère de la tunique sporale (**Meyer et al., 2000**).

NB : Un grand nombre de bactéries sporulées peuvent synthétiser des métabolites tels que des toxines ou des antibiotiques. De ce fait, *Bacillus licheniformis* produit la bacitracine, *Bacillus polymyxa* élabore la polymyxine. Ces deux antibiotiques sont produits au moment de l'engagement irréversible dans le processus de la sporulation.

II .4. Mode d'action des antibiotiques :

Un antibiotique est une molécule qui va empêcher la multiplication des bactéries ou entraîner leur destruction en agissant sur une ou plusieurs étapes métaboliques indispensables à la vie de la bactérie.

On distingue deux types d'antibiotiques :

Les antibiotiques bactéricides : qui tuent les bactéries

Les antibiotiques bactériostatiques : qui ralentissent la croissance bactérienne pouvant aller jusqu'à l'arrêt de la croissance bactérienne.

Les antibiotiques agissent sur les bactéries en inhibant des fonctions physiologiques précises, telles que : la synthèse de la paroi, la réplication et la transcription de l'ADN, la synthèse protéique ou encore la respiration cellulaire. Pour exercer leur action, ils doivent se lier à des cibles spécifiques le plus souvent intra cellulaires **(Denis ,F et al,2016) .**

II .4.1. Les antibiotiques agissant sur la paroi bactérienne :

La plupart des antibiotiques agissant sur la paroi des bactéries sont en réalité des inhibiteurs du peptidoglycane. Ce sont des antibiotiques bactéricides. Parmi ces antibiotiques, on trouve : les Bêtalactamines, les Glycopeptides et la fosfomycine.

Les antibiotiques agissant sur la membrane cytoplasmique :

La polymyxine B et la colistine sont deux antibiotiques qui agissent sur la membrane cytoplasmique, en perturbant sa synthèse. Ils sont actifs sur les bacilles à Gram négatif.

II .4.2 . Les antibiotiques inhibant la synthèse protéique :

Après fixation sur des constituants spécifiques du ribosome bactérien (sous unités 30S et 50S), ces antibiotiques vont empêcher la traduction de l'ARN m et donc la formation de nouvelles protéines. C'est l'exemple des tétracyclines, aminosides, chloramphénicol, macrolides, acide fusidique et linézolide.

II .4.3. Les antibiotiques inhibant la synthèse ou le fonctionnement des acides nucléiques :

Les Rifampicines, Sulfamides, Quinolones et Triméthoprim inhibent la synthèse ou le fonctionnement des acides nucléiques de différentes façons selon les familles d'antibiotiques :

Inhibition de la réplication de l'ADN

Inhibition de la transcription /ARN polymérase

Diminution de la synthèse des précurseurs nucléotidiques

II .4.4. Les antibiotiques agissant sur le métabolisme intermédiaire :

Le cotrimoxazole est un antibiotique bactéricide, il inactive les enzymes impliqués dans la synthèse des porines et de certains acides aminés essentiels.

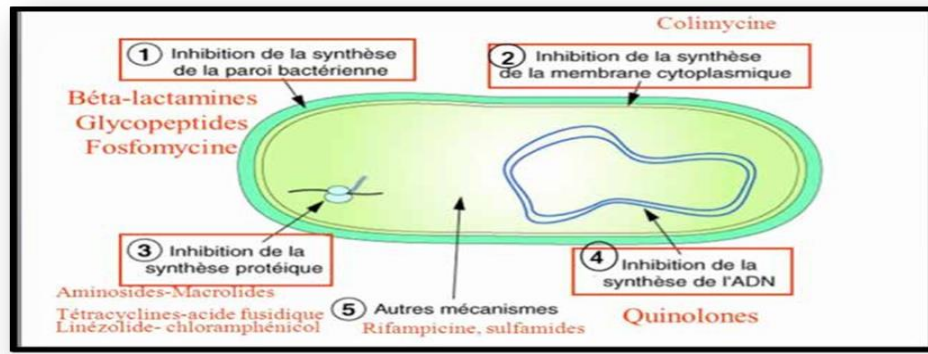


Figure36 : Principaux mécanismes d'action des antibiotiques

II .5. Principaux mécanismes de la résistance bactérienne aux antibiotiques :

La résistance bactérienne aux antibiotiques est une propriété intrinsèque du monde bactérien qui permet à la bactérie de s'adapter à son environnement. Il existe une multiplicité de mécanismes biochimiques et de systèmes génétiques permettant aux bactéries d'échapper à l'activité des antibiotiques. Cette diversité, combinée à l'utilisation extensive et fréquemment abusive des antibiotiques, rend compte de l'évolution vers la résistance des bactéries observée, principalement, au cours des dernières décennies (Denis ,F et al,2016) .

II .5.1. Définition de la résistance :

Une souche bactérienne est dite « résistante » quand elle supporte une concentration d'antibiotique notablement plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des autres souches de la même espèce. Autrement dit, les souches qui supportent des concentrations critiques d'antibiotiques plus élevées que celles qu'ils sont possibles d'atteindre in vivo.

Il existe deux grands types de résistance aux antibiotiques, la résistance intrinsèque naturelle et la résistance acquise (Gentilini M et al ;2011).

II .5.1.1.La résistance naturelle :

Est présente chez toutes les bactéries de la même espèce ou du même genre bactérien. Elle délimite le spectre d'action des antibiotiques. Par exemple, la présence d'une membrane externe

chez les bacilles à Gram négatif entraîne la résistance à diverses classes de molécules par imperméabilité (glycopeptides, macrolides, lincosamides, streptogramines, etc.) (**Gentilini M et al ;2011**).

Autres exemples de résistance naturelle :

Famille ou espèces	Bactéries à Gram Positif	Bactéries à Gram négatif	Anaérobie	Genre Klebsiella	Enterocoque faecalis
Antibiotiques Présentant une R.naturelle	Colistine Acide nalidixique	Vancomycine	Aminosides	Amoxicilline Ticarcilline Pipéracilline	Céphalosporines Lincomycine Clindamycine

II .5.1.2. La résistance acquise :

Elle n'est présente que chez certaines souches de la même espèce ou du même genre et naturellement sensible à un antibiotique, à titre d'exemple la résistance du Pneumocoque à la pénicilline, ou la résistance du Pseudomonas à l'imipénème. Dans certains cas, elle peut concerner la grande majorité de ces souches comme, par exemple, la production de pénicillinase chez le staphylocoque qui intéresse plus de 95 % des souches (**Gentilini M et al ;2011**).

II .5.1.3. La résistance croisée :

Correspond à la résistance à tous les membres d'une classe d'antibiotiques due à un seul mécanisme de résistance. La résistance est de niveau variable selon les antibiotiques, en général d'autant plus faible que la molécule est plus active. Parmi les nombreux cas de résistance croisée, on peut citer les mutations conférant la résistance aux fluoroquinolones.

La conséquence majeure de la résistance croisée est la sélection croisée : n'importe quel antibiotique de la classe peut sélectionner des bactéries résistantes à tous les autres membres.

Sur le plan génétique, la résistance peut être acquise par deux voies totalement distinctes :

Soit des mutations dans le génome touchant un gène de structure ou un gène de régulation, on parlera alors de transmission verticale à la descendance. Ce type de résistance reste peu fréquent, il représente environ 10% de la résistance observée en clinique, mais peut poser de graves problèmes thérapeutiques comme la résistance du *Mycobacterium tuberculosis* aux anti-bacillaires.

Soit l'acquisition d'information génétique étrangère liée à des éléments génétiques mobiles (plasmides, transposon ou intégron), en provenance d'autres bactéries, par transfert horizontal. Les résistances plasmidiques peuvent concerner plusieurs antibiotiques, voire plusieurs familles

d'antibiotiques. Elles représentent le mécanisme de résistance le plus répandu, soit 80 % des résistances acquises et sont responsables des épidémies à bactéries multi résistantes en milieu hospitalier.

Sur le plan biochimique, les bactéries ont développé quatre grands mécanismes d'acquisition de la résistance dont le motif commun est d'empêcher l'interaction de l'antibiotique avec sa cible (Gentilini M et al ; 2011).

II .5.1.4. La modification de la cible :

Ce mécanisme entraîne une perte d'affinité de l'antibiotique qui ne peut plus se lier à la cible sur laquelle il agit habituellement.

Soit la résistance est due à la production d'enzymes qui, en modifiant les cibles cellulaires, leur font perdre leur affinité pour les agents anti infectieux.

Soit, cette résistance aux antibiotiques peut résulter de mutations spontanées qui en introduisant des substitutions d'acides aminés, ou de bases nucléiques dans les cibles moléculaires, leur font perdre leur affinité pour les agents anti microbiens (Gentilini M et al ;2011).

1. La production d'une enzyme qui va détoxifier l'antibiotique :

Un des mécanismes de résistance les plus répandus et des plus efficaces consiste, pour les bactéries à modifier la structure même de l'antibiotique de façon à lui faire perdre sa capacité à se lier à sa cible cellulaire, et par voie de conséquence à l'inhiber. Il repose sur la production d'enzymes dont l'origine peut être intrinsèque (gène chromosomique appartenant à l'espèce) ou extrinsèque (gène transmis par des plasmides ou des transposons).

2. L'imperméabilité

Notamment par diminution du diamètre des porines (pores au niveau de la membrane externe) chez les bacilles à Gram négatif : A l'exception des Polymixines et des Aminoglycosides, les antibiotiques actifs sur les bactéries à Gram négatif traversent la membrane externe par diffusion passive à travers les porines. La diminution quantitative ou qualitative au niveau de ces porines peut freiner la pénétration intra cellulaire des agents anti microbiens, et conférer de ce fait, un bas niveau de résistance à plusieurs familles d'antibiotiques.

3. L'efflux des antibiotiques à l'extérieur de la cellule par des pompes énergie dépendantes

Est un processus de transport membranaire assez répandu dans le monde vivant pour maintenir l'homéostasie cellulaire, et qui consiste à refouler de façon active les agents nocifs dans le milieu extérieur. Certains d'entre eux sont intrinsèques, d'autres apportés par des éléments génétiques mobiles.

4. Les Bêtalactamases

sont des enzymes d' inactivation de type sérine (classes A, C et D) ou métallo enzymes (classe B) dont les substrats sont des bêtalactamines.

5. La production de bêtalactamase

Est un mécanisme que l'on retrouve aussi bien chez les bactéries à Gram positif que Gram négatif, il s'agit du mode de résistance le plus courant. Le support génétique qui code pour ces enzymes est soit d'origine plasmidique soit chromosomique.

6. L'inactivation enzymatique

(perte de l'activité antibiotique) survient lors de l'ouverture du cycle bêtalactame (structure de base des bêtalactamines). Ainsi l'hydrolyse du cycle bêtalactame empêche les bêtalactamines de se fixer de façon covalente sur le site actif des enzymes impliquées dans la synthèse de la paroi, les protéines liant les pénicillines (PLP).

7. Plusieurs centaines de bêtalactamases ont été identifiées chez diverses espèces bactériennes. Ces enzymes peuvent être classées en fonction de leur spectre d'activité (pénicilline, oxacilline, céphalosporines, carbapénèmes), ou leur séquence en acides aminés, c'est la classif en pratique.

8 Pénicillinase: inactive toute les pénicillines (βactamases inhibées par les inhibiteurs des βactamases (IβL)) Les BLSE sont des enzymes de type Pénicillinase de classe A plasmidiques, qui présentent un potentiel de diffusion et une prévalence justifiant une surveillance épidémiologique. Elles confèrent une résistance à toutes les Pénicillines, aux Céphalosporines de 1ère et 2ème génération et aux Céphalosporines de 3ème et 4ème génération et à l'Aztréonam. Elles n'inactivent pas les Céphamycines (Céfoxitine, Céfotetan), ni les Carbapénèmes. La sensibilité aux associations Pénicillines-inhibiteurs de bêtalactamases est souvent conservée. Cependant, le phénotype de résistance varie avec la nature de la BLSE produite et selon leur niveau de production.

9. Céphalosporinase : inactive les C1G voire les C2G mais aussi l'amoxicilline (elles ne sont pas inhibées par les IβL)

10. Carbapénémase : inactive les carbapénèmes (imipénème: bêta- lactamine qui a le spectre le plus large).

II .6. Les Infections bactériennes :

Une infection désigne l'envahissement puis la multiplication de micro-organismes au sein d'un organe du corps vivant. Ces micro-organismes peuvent être des bactéries comme les (streptocoques ou les staphylocoques dans les infections cutanées, les Escherichia Coli dans les infections urinaires) l'organisme va instaurer des procédés de défense pour éradiquer le micro-organisme

indésirable (**Baron et al, 1996**).

La gravité de l'infection dépend de la capacité du micro-organisme infectant à endommager l'hôte ainsi que de la capacité de l'hôte à résister au micro-organisme. Cependant, le système immunitaire d'un hôte peut également causer des dommages à l'hôte lui-même pour tenter de contrôler l'infection (**Baron et al, 1996**)

II .6. 1. Classification des agents pathogènes :

Les cliniciens classent donc les micro-organismes ou microbes infectieux en fonction du statut des défenses de l'hôte - soit comme agents pathogènes primaires, soit comme agents pathogènes opportunistes (**Baron et al, 1996**):

II .6. 1. 1 . Agents pathogènes primaires :

Les agents pathogènes primaires provoquent des maladies en raison de leur présence ou de leur activité au sein de l'hôte normal et sain, et leur virulence intrinsèque (la gravité de la maladie qu'ils causent) est, en partie, une conséquence nécessaire de leur besoin de se reproduire et de se propager (**Baron et al, 1996**).

II .6. 1. 2 . Agents pathogènes opportunistes :

Les agents pathogènes opportunistes peuvent provoquer une maladie infectieuse chez un hôte présentant une résistance déprimée (immunodéficience) ou s'ils ont un accès inhabituel à l'intérieur du corps (par exemple, via un traumatisme). Une infection opportuniste peut être causée par des microbes habituellement en contact avec l'hôte, tels que des bactéries pathogènes ou des champignons dans les voies gastro-intestinales ou des voies respiratoires supérieures, et elles peuvent également résulter de microbes (autrement inoffensifs) acquis auprès d'autres hôtes (comme dans la colite à *Clostridium difficile*.) ou de l'environnement à la suite d'une introduction traumatique (comme dans les infections de plaies chirurgicales ou les fractures composées). Une maladie opportuniste nécessite une altération des défenses de l'hôte, qui peut survenir à la suite de défauts génétiques (tels que la maladie granulomateuse chronique), l'exposition à des médicaments antimicrobiens ou à des produits chimiques immunosuppresseurs (comme cela peut se produire après un empoisonnement ou une chimiothérapie anticancéreuse), une exposition à des rayonnements ionisants, ou à la suite d'une maladie infectieuse à activité immunosuppressive (comme la rougeole, le paludisme ou le VIH).

Les agents pathogènes primaires peuvent également provoquer une maladie plus grave chez un hôte avec une résistance déprimée que ce qui se produirait normalement chez un hôte immun-suffisant (**Baron et al, 1996**).

II .7.Toxicogenèse :

Un certain nombre de bactéries libèrent des substances toxiques pour les êtres vivants qui les ingèrent ou qui entrent à leur contact. Dans certains cas (*tétanos* et *botulisme* par exemple), seule la toxine est pathogène et la multiplication du microorganisme ne participe en rien aux symptômes observés. Ces toxines sont soit des protéines solubles, thermolabiles, à fort pouvoir toxique, antigénique et vaccinant et qui sont libérées en dehors de la cellule bactérienne, essentiellement par des bacilles Gram positif (exotoxines), soit des complexes glucido-lipido-polypeptidiques, insolubles, thermostables, de toxicité modérée, peu antigéniques et peu vaccinatés et qui restent partie intégrante du germe qui les élabore (endotoxines des bacilles Gram négatif). La plupart de ces toxines sont des centaines de milliers de fois plus toxiques que les plus dangereux poisons minéraux ou organiques (Arsenic, Strychnine, venins de serpents, etc.). Toutefois, ces toxines peuvent être facilement dénaturées. Cette dénaturation conduit à la formation d'anatoxines, dépourvues de toxicité, mais gardant leur pouvoir antigénique. Ces anatoxines servent à la préparation des vaccins (antidiphtérique, antitétanique, etc.) ou de sérums thérapeutiques (anti-botulique, antitétaniques etc. (Cavaillon et al, 1996). On distingue plusieurs types de toxines :

II .7.1. Les toxines A-B :

Ce type de toxines a deux composants, la sous-unité B qui est responsable de l'interaction avec les cellules de l'hôte et la sous-unité A qui contient l'activité enzymatique (toxique). Cette activité varie d'une toxine à l'autre et peut être une activité ADP ribosylante (toxine *cholérique*, toxine *pertussique* et toxine *diphtérique*) ou une activité protéolytique (toxine *tétanique* ou toxine *botulinique*). La sous-unité B varie d'une toxine à l'autre et est responsable des spécificités tissulaires. Quant à la sous-unité A, elle est conservée spécialement dans les régions responsables de l'activité enzymatique (Zaouia et al, 2020).

II .7.2.Les toxines formant des pores :

Une famille de toxines est responsable de la formation de pores conduisant à la lyse cellulaire. A titre d'exemple, il s'agit de l'hémolysine d'*Escherichia coli*, de la listériolysine (hémolysine) de *Listeria monocytogenes* (Zaouia et al, 2020).

II .7.3 .Les enzymes hydrolytiques :

Beaucoup de bactéries pathogènes produisent des protéases, ADNases, collagénases qui vont participer à la formation des lésions au siège de la multiplication bactérienne (Zaouia et al, 2020).

II .8. L'antibiogramme :

II .8.1. Définition :

Un antibiogramme est une technique de laboratoire visant à tester la sensibilité d'une souche bactérienne vis-à-vis d'un ou plusieurs antibiotiques supposés ou connus (**Bourabahet al, 2015**)

II .8.2. Le but de l'antibiogramme :

Le choix de l'antibiotique est réalisé de manière très empirique dans la plupart des infections banales débutantes : le médecin prescrit, en fonction de l'examen clinique, la molécule dont l'efficacité lui paraît la plus probable (antibiothérapie dite probabiliste).

Ce n'est que dans les infections graves, récidivantes ou les échecs thérapeutiques que l'on fait appel au laboratoire qui réalisera une culture et un antibiogramme.

Un antibiogramme permet de tester sur milieu de culture, l'action de molécules antibiotiques sur une souche bactérienne. Il donnera donc des indications sur l'efficacité *in vitro* de ces antibiotiques (**Bourabah. et al, 2015**)

II .8.3.Principe :

Le principe consiste à placer la culture de bactéries en présence du ou des antibiotiques et à observer les conséquences sur le développement et la survie de celle-ci. On peut par exemple placer plusieurs pastilles imbibées d'antibiotiques sur une souche bactérienne déposée dans une boîte de Pétri (**Bourabahet al, 2015**).

II .8.4. Les techniques d'antibiogramme :

- **Méthodes de dilution** : les méthodes de dilution sont effectuées en milieu liquide ou en milieu solide. Elles consistent à mettre un inoculum bactérien standardisé au contact de concentrations croissantes d'antibiotiques (**Bourabah et al, 2015**).
- **Méthodes de diffusion (Antibiogramme standard)** : Pour réaliser l'antibiogramme par la méthode des disques, la culture bactérienne estensemencée à la surface d'une gélose spécialement étudiée, la gélose de Mueller-Hinton, éventuellement additionnée de sang. Des disques pré-imprégnés d'une dose connue d'antibiotique sont déposés à la surface de la gélose. L'antibiotique diffuse à partir du disque en créant un gradient de concentration. La détermination du diamètre de la zone d'inhibition permet une estimation de la concentration minimale inhibitrice. Les caractères de sensibilité ou de résistance de la souche bactérienne enseront déduits (**Bourabah et al, 2015**).

II .9. Concentration minimale inhibitrice (CMI) :

CMI est la plus petite quantité d'antibiotique(ATB) capable d'inhiber une croissance visible à l'œil nu. La CMI d'un germe donné peut être mesurée par différents procédés de laboratoire, cette technique utilise des disques de papier buvard imprégnés d'une concentration donnée d'antibiotique déposé à la surface d'une gélose spécifique coulée en boîte de Pétri uniformément ensemencée d'une suspension (100bactéries/mL) de la bactérie étudiée : **(figure 39) (Bourabah et al, 2015).**

II .9.1.La bactérie est sensible :

À l'antibiotique quand la CMI est inférieure à la concentration critique inférieure. Concrètement, ceci signifie qu'il suffit d'une faible concentration d'antibiotique pour tuer les bactéries et que cette dose nécessaire est encore plus faible que la plus faible des doses qu'on peut administrer chez l'homme. Donc en clair, si on traite quelqu'un avec l'antibiotique, la concentration de celui-ci dans l'organisme sera toujours suffisante pour tuer les bactéries **(Bourabah et al, 2015).**

// .9.2. La bactérie est résistante :

À l'antibiotique quand la CMI est supérieure à la concentration critique supérieure. Concrètement, la dose nécessaire pour tuer les bactéries est bien trop élevée pour être supportée chez l'homme sans effets secondaires importants. Cet antibiotique ne peut pas être utilisé pour traiter une infection **(Bourabah et al, 2015).**

// .9.3La bactérie est intermédiaire :

À l'antibiotique quand la CMI est comprise entre les deux concentrations critiques. En pratique, ça correspond à une situation où la concentration est tantôt suffisante pour tuer les bactéries, tantôt insuffisante. Il faut considérer que la bactérie sera résistante *in vivo* et il ne faut pas utiliser cet antibiotique **(Bourabahl et al, 2015).**

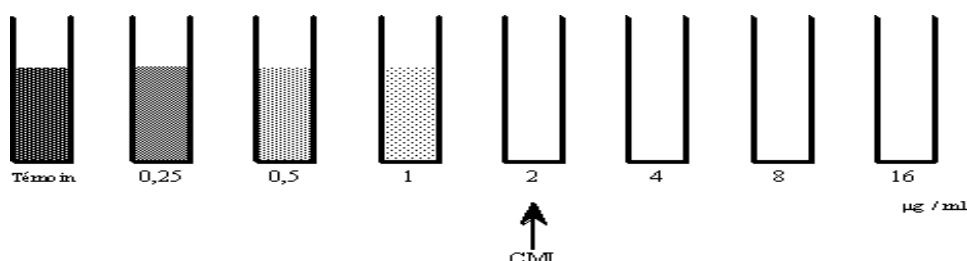


Figure 37 : Détermination de la CMI par dilution en milieu liquide.

PARTIE II

SYNTHESE EXPERIMENTALE



CHAPITRE 1

Matériel et Méthode



Notre étude a été menée au laboratoire de recherche sur la valorisation et la technologie des ressources sahariennes (VTRS) de l'Université d'Echahid Hamma Lakhdar à Eloued.

I.1 . Matériel :

I.1.1. Matériel végétal :

Le plante choisie pour cette étude : Croute d'orange

Echantillon : d'orange de la région de Guemar été procuré du marché local à Eloued, Algérie durant le mois de Février 2023.

I.1.2. Réactifs utilisés :

- **Amoxicilline :**

L'amoxicilline, obtenue depuis l'hôpital de Ben Omar Djilani, a été utilisée telle quelle sans purification.

- **Microorganismes utilisés :**

Tous les microorganismes utilisés dans ces études ont été fournis par le laboratoire pédagogique de la faculté de biologie.

Escherichia coli (ATCC 25922) : appartient à la famille des Enterobacteriaceae. Il est non sporulé, de type anaérobie facultatif et généralement mobile grâce à des flagelles. Sa longueur varie de 2 à 6 μm et sa largeur de 1.1 à 1.5 μm (Sauer and Moraru et al 2009).

Staphylococcus (ATCC 25923) : est une bactérie à Gram positif de forme sphérique de 0.5 à μm de diamètre appartenant au genre Staphylococcus (Treangen et al. 2014).

I.1.3. Matériels de laboratoire :

Plaque chauffante	Auto clave	Pipettes pasteur
Balance électrique	Bain marie	Portoir pour tubes spéciaux
Boîte de pétrie	Bec benzène	Papier filtre
Etuve	Micropipettes ajustables	tube à essai

I.1.4. Produits chimiques :

Diméthylsulfoxyde (OS₆H₂C)	Eau distillée H₂O	L'alcool à 95 %	Ethanol (EtOH)
Gélose Muller Hinton	Eau physiologique stérile 0,9%	Méthanol (CH₃OH)	Dichlorométhane(C H₂Cl₂)

I.2.méthodes :

I.2.1.Extraction de Naringine :

Le protocole d'extraction de la naringine à partir de la peau d'orange est généralement effectué en plusieurs étapes, tel que décrit dans la référence utilisée pour cette expérience (**Sudto, Pornpakakul, and Wanichwecharungruang et al ; 2009**).

a. Épluchage : 4 kg d'orange bien lavé ont été épluchés à l'aide d'un couteau aiguisé **Figure 38**.

b.Séchage : Les croûtes ont été séchées à la lumière du soleil pendant 5 jours. Ensuite, la moitié des croûtes ont été séchées dans un four de séchage à 40°C pendant 2 jours **Figure39**.

Le poids des croûtes séchées était de 117.9615 g.

A. Broyage : Les croûtes séchées ont été broyées pour obtenir une poudre **Figure 40**.



Figure 38 : Orange



Figure 39 : Crouste d'orange pendant le séchage



Figure 40 : Poudre de croûtes sec

d. Extraction : 30 g de la poudre ont été mélangés avec 200 ml de méthanol et laissés pendant 3 jours. La bouillie obtenue a été filtrée et l'extrait méthanique obtenu a été séché avec un évaporateur rotatif sous pression réduite à 35°C pour évaporer le méthanol **Figure 41**.

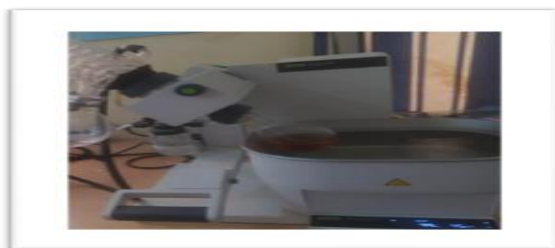


Figure 41: Montage d'évaporation à pression réduite

e. Dissolution : Soixante millilitres d'eau distillée ont été ajoutés à l'extrait méthanoïque, puis le mélange a été agité à bain-marie (**Figure 42**) à une température de 70°C pendant une durée de 30 minutes.



Figure 42: Montage de chauffage

f. Cristallisation : Le mélange a été transféré dans un ampoule à décanté (**Figure 43**) et 10 ml de solution dichlorométhane ont été ajoutés. Le mélange a été enveloppé avec du papier aluminium pour éviter la lumière et laissé pendant 3 à 4 jours à 25°C pour permettre la cristallisation du naringine dans la couche aqueuse.



Figure 43 : Montage de cristallisation utilisation de l' ampoule à décanter

G .Récupération : Les cristaux de naringine ont été recueillis par filtration sur papier filtre et lavés avec de l'eau distillée 3 fois, puis séchés dans une étuve.

Cette opération a été répétée 3 fois afin de collecter le maximum de rendement.

I.2.2. Rendement d'extraction :

Rendement d'extraction (%) = $(\text{Masse de Naringine} / \text{Masse initiale de plante}) \times 100$ Où la masse de Naringine est la quantité de composé que nous avons réussi à extraire après la procédure d'extraction, et la masse initiale de plante est la quantité de plante à partir de laquelle l'extraction a été réalisée.

Le rendement d'extraction moyen pour le naringine était de 2% (poids sec). Ces résultats indiquent que la méthode d'extraction par solvant a été efficace pour extraire le naringine d'orange.

I.2.3. Caractérisation du Naringine :

La caractérisation de naringine est le processus de détermination de la structure et des propriétés physiques et chimiques de ce composé. Cela implique l'utilisation de diverses techniques d'analyse pour identifier les différents groupes fonctionnels, les liaisons, les isomères et les stéréoisomères présents dans la molécule (**Chang and Guo 1992; Decesari et al. 2000; Simoneit 1986**).

Les informations recueillies lors de la caractérisation d'un composé organique permettent de déterminer sa composition, sa pureté, sa stabilité, ses propriétés physiques et chimiques, sa réactivité, ainsi que son potentiel d'application en biologie, en médecine, en pharmacologie, en chimie, en cosmétique, en alimentation, en agriculture, etc (**Rissanen et al. 2006; H. Wang et al. 2013; Wild 2003**).

I.2.3.1. Caractérisation par Infrarouge (IR) :

La caractérisation par infrarouge (IR) est une technique d'analyse qui utilise la spectroscopie infrarouge pour déterminer la présence de liaisons chimiques dans les molécules (**López- Lorente and Mizaikoff et al ;2016**). Le principe de cette technique est basé sur l'absorption de la lumière infrarouge par les liaisons chimiques des molécules. Chaque type de liaison chimique absorbe une fréquence d'onde spécifique, ce qui permet d'identifier les différentes liaisons présentes dans la molécule (**Boskey and Mendelsohn et al, 2005**).

✓ **Appareillage :**

L'analyse par IR, a été réalisée sur un spectrophotomètre infrarouge modèle SHIMADZU. L'échantillon est préparé sous forme de pastille KBr (bromure de potassium) qui est un matériau transparent aux infrarouges.

✓ **Procédure :**

L'échantillon est placé dans le spectrophotomètre et une source de rayonnement infrarouge est dirigée sur l'échantillon. La lumière infrarouge qui traverse l'échantillon est ensuite détectée par un détecteur, et la quantité de lumière absorbée à chaque fréquence est mesurée.

I.2.3.2. Caractérisation par spectroscopie UV-Visible :

La caractérisation par UV (ou spectrophotométrie UV-Visible) est une technique utilisée pour étudier les propriétés d'absorption de la lumière des composés organiques (**Jablonský et al. 2015**). Elle permet de mesurer la quantité de lumière absorbée par une solution en fonction de la longueur d'onde (**Begum et al. 2018**).

✓ **Appareillage :**

Les mesures UV-Vis ont été effectuées en utilisant un spectromètre UV-Vis (Shimadzu 1800) et une cellule de quartz ayant une capacité volumétrique de 3 ml. L'acquisition de données a été accomplie avec un micro-ordinateur Pentium IV (CPU 4.0 GHz et RAM 2 Go) doté d'un logiciel UV probe version 2.34 (Shimadzu). Les données sont traitées en utilisant le logiciel OriginLab.

✓ **Procédure :**

Pour la caractérisation du naringine par UV, on prépare une solution de méthanol à une concentration connue du naringine, puis on la place dans la cuve du spectrophotomètre. On sélectionne ensuite le domaine de balayage de la longueur d'onde (de 900 à 200 nm) et on mesure l'intensité de la lumière transmise par la solution.

I.2.3.3 Caractérisation par Chromatographie sur couche mince (C.C.M) :

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une technique de caractérisation et séparation analytique qui permet de séparer et d'identifier différents composants d'un mélange en utilisant une phase stationnaire solide et une phase mobile liquide (**Spangenberg, Poole, and Weins et al ;2011**).

La chromatographie sur couche mince est une technique rapide et économique qui permet de séparer et d'identifier efficacement différents composants d'un mélange. C'est une méthode courante en chimie analytique pour la caractérisation de composés organiques et elle est utilisée dans de nombreux domaines de recherche, notamment la chimie, la biochimie et la pharmacologie (**Sherma et al ; 2000**).

✓ Appareillage :

Pour caractériser le naringine par CCM, nous utilisons une plaque de silice gel comme phase stationnaire.

Cette plaque est recouverte d'une fine couche de gel de silice, qui est activée en la chauffant à une température élevée. L'éthanol absolu est utilisé comme une phase mobile.

✓ Procédure :

La procédure de chromatographie sur couche mince pour caractériser le naringine est la suivante :

1. Préparer la plaque de silice gel en coupant la taille souhaitée pour l'expérience et en la marquant sur un côté avec un crayon graphite.
2. Préparer la solution de naringine à tester en la diluant dans l'éthanol et en l'appliquant sur la plaque à l'aide d'une pipette.
3. Laisser sécher la plaque jusqu'à ce que la solution soit complètement absorbée et que la plaque soit sèche.
4. Placer la plaque dans une cuve contenant l'éthanol de manière à ce que la plaque soit immergée de quelques millimètres dans le solvant.
5. Laisser la plaque dans la cuve jusqu'à ce que le solvant ait migré sur toute la hauteur de la plaque.
6. Retirer la plaque de la cuve et laisser sécher.
7. Révéler les composants de l'échantillon en utilisant un l'iode solide, qui fera apparaître des taches colorées sur la plaque.
8. Identifier le composant d'intérêt en comparant la position de la tâche à celle des taches de référence de composés purs.

I.2.3.4. Caractérisation par La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) :

L'HPLC (High Performance Liquid Chromatography), ou chromatographie liquide haute performance, est une technique de séparation des composants d'un mélange à travers une colonne de chromatographie remplie de particules stationnaires, où les composants sont séparés en fonction de leurs affinités avec la phase stationnaire et mobile (Žuvela et al. 2019).

✓ **Appareillage :**

Le modèle de chromatographie liquide Shimadzu Prominence a été utilisé pour réaliser la caractérisation du naringine. L'expérience a été conduite à l'aide d'un compartiment de colonne thermostable, d'un dégazeur en ligne et d'un détecteur UV SPD-20A. Une colonne analytique Shim-pack VP-ODS C18 (4,6 mm x 250 mm, 5 µm, fournie par Shimadzu Co., Japon).

✓ **Procédure :**

La procédure de caractérisation du naringine par HPLC commence par la préparation d'un échantillon en solution acétonitrile/méthanol à une concentration connue. Cette solution est ensuite injectée dans la colonne de chromatographie à l'aide d'une pompe à haute pression, qui pousse la solution à travers la colonne. Les composants du mélange se séparent alors en fonction de leurs affinités avec la phase stationnaire et mobile. Le détecteur spectrophotomètre mesure l'absorption des composants individuels au fur et à mesure qu'ils traversent la colonne. Les données sont ensuite enregistrées par le système informatique pour analyse ultérieure.

I.2.4. Méthodes d'évaluation *In Vitro* des activités biologiques :

Toutes les expériences *in vitro* ont été effectuées à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis (Shimadzu 1800). Les données ont été acquises à l'aide d'un microordinateur Pentium IV (CPU 4.0 GHz et RAM 2 Go) utilisant le logiciel UV Probe version 2.34 (Shimadzu). Les graphiques ont été tracés et les calculs ont été effectués en utilisant le logiciel OriginLab version 9.0 (Integral Software, France).

I.2.4.1. Evaluation *in vitro* de l'activité antibactérienne :



Mode opératoire :

Les tests antimicrobiens ont été conduits afin d'évaluer l'activité biologique du naringine contre *Escherichia coli* et *Staphylococcus*. L'activité antimicrobienne a été évaluée par la méthode de diffusion des disques décrite dans la littérature (Klančnik et al. 2010) :

✓ *Préparation des produits à tester* : Dissolution du naringine dans le DMSO pour préparer des

solutions de concentrations différentes de 2 à 40 mg/ml.

- ✓ *Préparation des précultures* : Cultivation des souches microbiennes à tester dans des boîtes de Petri contenant de la gélose nutritive et incubation pendant 24 heures à 37°C afin d'obtenir une culture jeune des bactéries et des colonies isolées.
- ✓ *Préparation des disques* : Préparation des disques par papier Wattman de 6mm de diamètre, suivie d'une stérilisation pendant 30 minutes à 120°C dans l'autoclave.
- ✓ *Préparation des suspensions bactériennes* : Prélèvement de quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques à l'aide d'une pipette pasteur et mise en suspension dans 10 ml d'eau physiologique stérile à 0.9% de sel (NaCl). Standardisation de la suspension bactérienne à l'aide d'un densimètre pour l'ensemencement dans le milieu MH.
- ✓ *Préparation des milieux de culture* : Utilisation de différents milieux de culture : bouillon nutritif pour l'isolement et l'entretien des souches bactériennes, gélose nutritive pour la réactivation de la souche bactérienne, gélose Mueller-Hinton pour l'étude de la sensibilité des bactéries aux différentes concentrations de naringine.
- ✓ *Test de l'activité antibactérienne* : Étalage de la suspension bactérienne sur la surface entière de la gélose Mueller Hinton (GMH) à trois reprises à l'aide d'un écouvillon stérile, puis laisser sur la paillasse pendant 30 minutes. Lecture de l'activité antibactérienne en mesurant à l'aide d'une règle le diamètre de la zone d'inhibition et comparaison avec celle de DMSO comme contrôle négatif et l'antibiotiques comme contrôle positif (Amoxicilline 25 µg/disc). Mesure de l'absorbance par la spectroscopie UV-vis.

L'activité inhibitrice des bactéries a été calculée en pourcentage d'inhibition en utilisons l'équation suivante (Klančnik et al. 2010):

$$\% \text{ Inhibition} = \left(1 - \frac{\text{Abs Naringine}}{\text{Abs Controle}} \right) \times 100$$

Les concentrations entraînant une inhibition de 50 % de l'activité enzymatique (IC₅₀) ont été déterminées graphiquement.

I.2.5. Méthodes d'évaluation *In Silico* des activités biologiques :

I.2.5.1. Évaluation de l'activité biologique par amarrage moléculaire :

I.2.5.1.1. Préparation des ligands :

Dans le cadre de la réalisation d'études d'amarrage moléculaire, il convient en premier lieu d'obtenir une structure tridimensionnelle parfaitement optimisée du composé à étudier. Cette étape est généralement entreprise en recourant à la théorie fonctionnelle de la densité (DFT), sans recourir à des contraintes de symétrie (Becke et al ;1993). Les calculs sont réalisés au moyen du logiciel

Gaussian 09 (Frisch et al. 2009), en utilisant la fonctionnelle d'échange de Becke ainsi que la fonctionnelle de corrélation de Lee, Yang et Parr (B3LYP), en combinaison

l'ensemble de base 6-311G+ +(d,p) (Becke 1993; Frisch et al. 1988). La structure optimisée de composé est représentée dans la(**Figure44**).

Quant au structure bidimensionnelles (2D) de l'amoxicilline, elles ont été extraites de la base de données DrugBank (<https://go.drugbank.com/>) (Wishart et al. 2018), avant d'être converties en structure tridimensionnelles (3D) et optimisées selon la même méthode, en vue de la réalisation d'études d'amarrage moléculaire. structure 3D un médicament standards sont présentées dans la(**Figure45**).

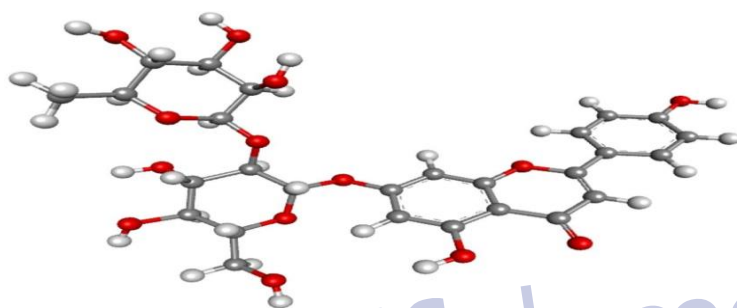


Figure44: Structure de naringine optimisé avec B3LYP/6-311++G(d,p)

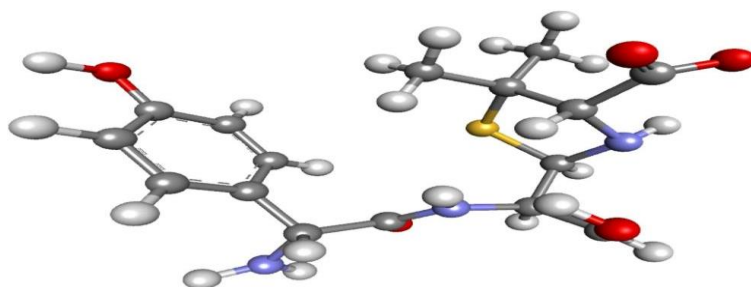


Figure 45 : Structure de : Amoxicilline extraites de la base de données DrugBank

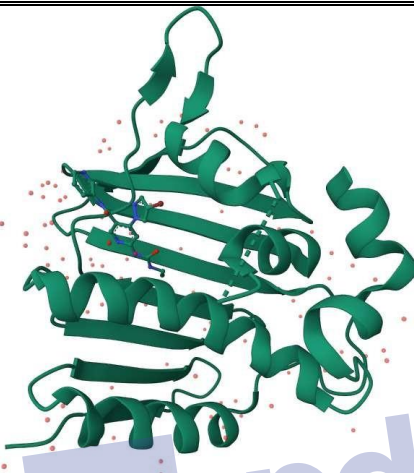
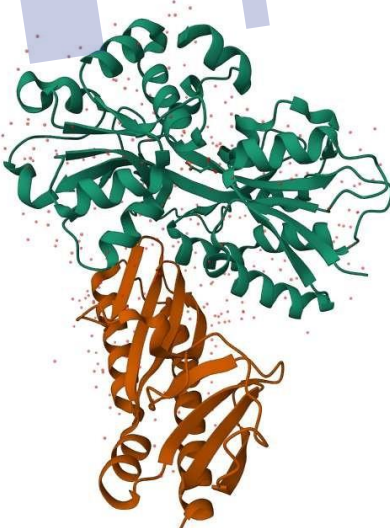
I .2.5.1.2. Préparation des récepteurs :

Les structures 3D des récepteurs, y compris le récepteur de Escherichia coli (PDB ID : 6F86) (Narramore et al. 2019) et Staphylococcus aureus (PDB ID : 6LKI) (M. Wang et al. 2020). Les informations relatives aux récepteurs, y compris leurs noms et leurs PDB ID, ont été répertoriées dans le **Tableau 6** suivantes.

Les structures ont été obtenues à partir de la banque de données sur les protéines RSCB (<https://www.rcsb.org/>) (Rose et al. 2016). Pour préparer ces récepteurs, AutoDock Tools (ADT)

a été utilisé. La préparation impliquait l'élimination de toutes les molécules d'eau et de cofacteurs pour obtenir la structure brute de chaque protéine. Ensuite, le site actif a été défini à l'aide du logiciel Molegro Virtual Docker (Bitencourt-Ferreira and de Azevedo et al ; 2019), suivi de l'ajout d'hydrogènes polaires avant l'attribution des charges de Kollman.

Tableau6: Les informations relatives aux récepteurs cibles sélectionnées pour les études d'amarrage moléculaire.

	<i>Crystal Structure of E. coli GyraseB 24kDa</i>	
	PDB ID	6F86
	Résolution (Å)	1.90
	Mutation	No
	R-Value	0.204
	Chaînes	A
	Organisme	Escherichia coli O157 :H7
	<i>Two-component system protein mediate signal transduction</i>	
	PDB ID	6LKI
	Résolution (Å)	1.78
	Mutation	No
	R-Value	0.210
	Chaînes	A
	Organisme	Staphylococcus aureus

I.1.5.1.3. Expériences d'amarrage Moléculaire :

Toutes les études de docking ont été effectuées sur un micro-ordinateur Pentium de 3.30 GHz, doté de 4.00 Go de mémoire RAM et d'un système d'exploitation Windows 10. Pour les calculs de docking, le programme AutoDock 4.2 (**Morris et al. 2009**), fondé sur l'algorithme génétique Lamarckien (LGA) avec recherche GA (**Morris, Huey, and Olson et al ; 2008**), a été utilisé. Les simulations de docking ont été réalisées en utilisant les paramètres par défaut, tandis que le nombre de runs a été fixé à 15, avec 150 individus et 2 500 000 évaluations d'énergie. La recherche a été menée sur une grille de 41 et 51 points par dimension, avec des points séparés de 0.500 Å. Les centres et les tailles de grille ont été déterminés pour chaque récepteur, tel qu'indiqué dans le **Tableau 7**, avec un pas de 0.500 centré sur le site actif de récepteur. À l'issue des runs d'amarrage, une énergie de liaison diverse des ligands a été obtenue avec leurs conformations respectives ; la pose d'amarrage énergétiquement la plus favorable a été utilisée pour l'analyse de docking (**Morris et al. 1998**). Les interactions d'amarrage ont été visualisées en utilisant les options d'interaction récepteur-ligand dans les logiciels : Discovery Studio v2.5 (**Systèmes 2016**), et PyMOL (Anaconda 3) (**DeLano 2002**) ainsi le serveur en ligne Protein- Ligand Interaction Profiler (<https://plip-tool.biotec.tu-dresden.de/plip-web/plip/index>) (**Salentin et al. 2015**).

Tableau 7 : Les paramètres de docking sélectionnés pour les récepteurs cible.

Protéines	Centre de Grille			Taille de Grille (Å)		
	X	Y	Z			
Escherichia coli	55.0	31.0	67.0	60	60	60
Staphylococcus aureus	-2.546	-23.991	1.652	50	50	50

CHAPITRE 2

RESULTATS ET DISCUSSION



Ce chapitre présente les résultats de l'extraction, de la caractérisation et de l'étude in-silico et in vitro de l'activité biologique du naringine, un composé présent dans la plante d'orange. L'objectif principal de cette étude était de déterminer l'activité biologique potentielle du naringine en tant que composé actif pour le développement de nouveaux médicaments. Les résultats présentés dans ce chapitre fournissent des informations détaillées sur la composition chimique du naringine, ainsi que sur son activité antibactérienne in vitro et ses interactions avec des protéines cibles in-silico. Les résultats de cette étude peuvent contribuer à la compréhension de l'activité biologique du naringine et à son potentiel en tant que composé actif dans le développement de nouveaux médicaments pour le traitement de diverses maladies.

II.1. Caractérisation :

La caractérisation chimique du naringine a été réalisée pour déterminer sa structure et sa pureté. Des analyses telles que la spectroscopie UV-Vis, la spectroscopie infrarouge (IR) ont été effectuées pour caractériser le composé.

II.1.1. Caractérisation par Chromatographie sur couche mince (C.C.M) :

Les résultats de la CCM ont montré que le naringine présentait une tache unique (**Figure46**) avec une R_f (facteur de rétention) = $\frac{\text{haute de la tache (h)}}{\text{haute du front du solvant(H)}}$ de 0.7407 lorsqu'il était évalué à l'aide de solvant Hexane- méthanol (7:3). La tâche de naringine a été révélée en utilisant l'Iode solide, qui a montré une coloration orange-brun caractéristique. Ces résultats ont confirmé la présence et la pureté de naringine dans l'extrait de la plante d'orange(**Giannuzzo et al. 2003**).

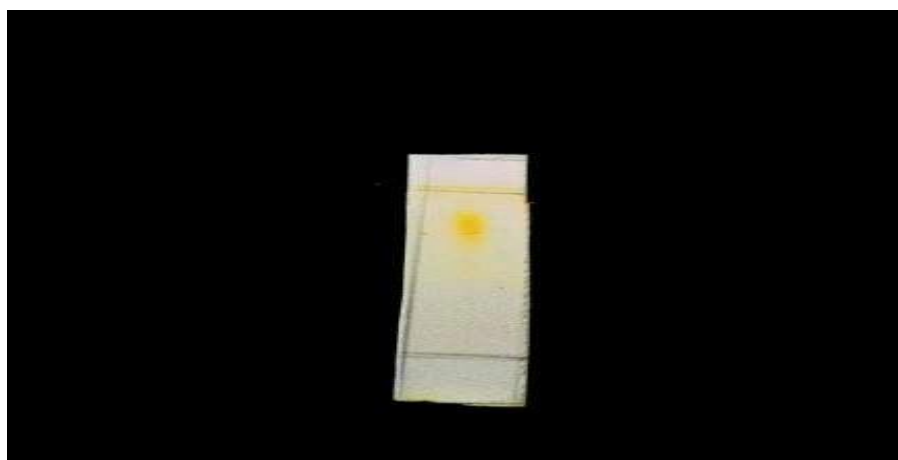


Figure46:Chromatographie sur couche mince (CCM) du naringine

II.1.2. Caractérisation par La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) :

Les résultats de la HPLC ont montré que le naringine présentait un temps de rétention de 34.128 ± 0.5 minutes (**Figure47**) lorsqu'il était séparé en utilisant le gradient de solvant acétonitrile-méthanol. De plus, les résultats de la HPLC ont montré que le naringine présentait un pic unique avec une pureté de 60%. Cela indique que le naringine a été correctement séparé des autres composants dans l'extrait et que la méthode de purification était efficace (**Yusof, Ghazali, and King et al ;1990**).

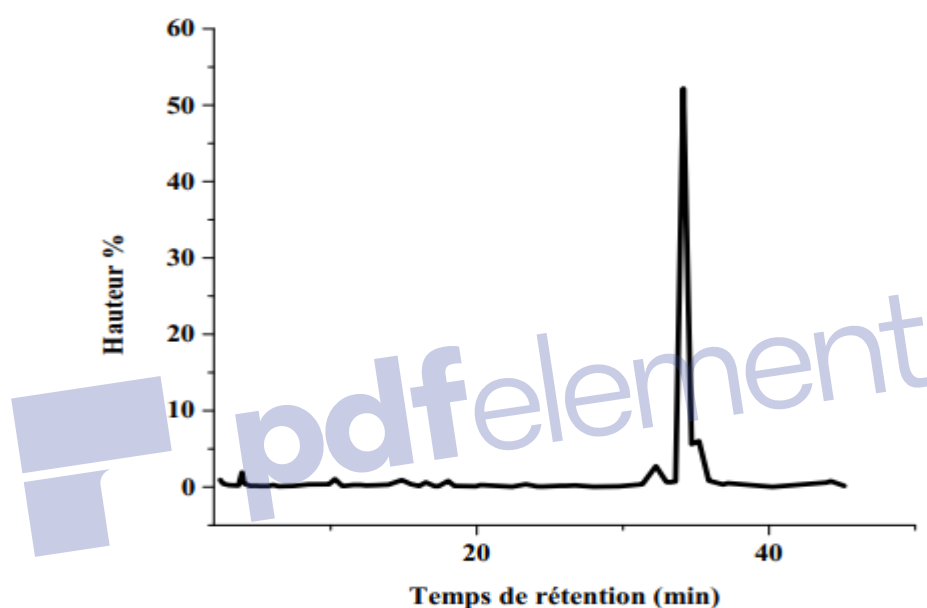


Figure47: Chromatogramme de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) du naringine

II.1.3. Caractérisation par Infrarouge (IR) :

Le naringine extrait d'orang a été caractérisé par spectroscopie infrarouge (IR) pour confirmer la présence de groupes fonctionnels caractéristiques de la molécule. Le spectre IR du naringine a été comparé à un spectre IR de référence de naringine, obtenu depuis Alfa Aeser (**Figure48**).

Le spectre IR du naringine a montré des pics de vibration caractéristiques pour les liaisons O-H, C-H, C=O et C-O. Le pic à 3404.91 cm^{-1} correspond à la liaison O-H caractéristique des groupes phénoliques présents dans la molécule de naringine. Le pic à 2933.92 cm^{-1} correspond à la vibration des liaisons C-H de l'anneau aromatique. Le pic à 1264.53 cm^{-1} correspondent à la vibration de la liaison C-O, qui est caractéristique des groupes ester et éther.

Dans le cas de la naringine, cette bande est attribuée à la présence d'un groupement éther.

Le pic à 1519.95 cm^{-1} est due à la vibration de déformation de la liaison C-C et C-O, qui est caractéristique des cycles aromatiques. Le pic à 1037.76 cm^{-1} est due à la vibration d'élongation de la liaison C-O-C, qui est caractéristique des groupes éther.

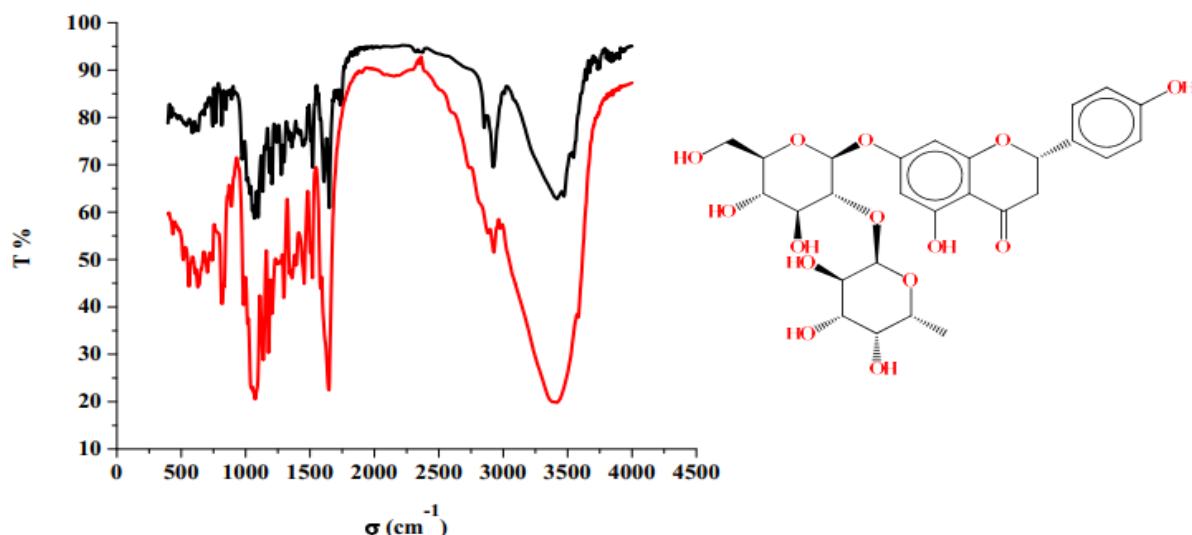


Figure48: Caractérisation du naringine extrait (Linge noire) et naringine référence (Linge rouge) par spectroscopie infrarouge (IR)

En comparant le spectre IR du naringine extrait avec le spectre IR de naringine référence, il a été observé que les deux spectres présentent des pics de vibration similaires, confirmant la présence du naringine dans l'échantillon extrait d'orange (Ghosal, Ghosh, and Das et al 2018).

II.1.4. Caractérisation par spectroscopie UV-Visible :

La spectroscopie d'absorption UV-visible a été utilisée pour caractériser le naringine extrait d'orange. Les mesures ont été effectuées à une longueur d'onde de nm (Figure49), correspondant au maximum d'absorption du naringine.

Le spectre d'absorption UV-visible du naringine a montré un pic intense à 283 nm, correspondant à une transition $\pi-\pi^*$ du groupement phénolique. Ce pic est caractéristique de la présence de groupes phénoliques dans la molécule de naringine, sont responsables de l'absorption dans cette région du spectre électromagnétique.

En comparant le spectre d'absorption UV-visible du naringine avec celui de la naringine de référence, il a été observé que les deux spectres présentent des pics d'absorption similaires, confirmant la présence du naringine dans l'échantillon extrait d'orange (Cordenonsi et al.2017).

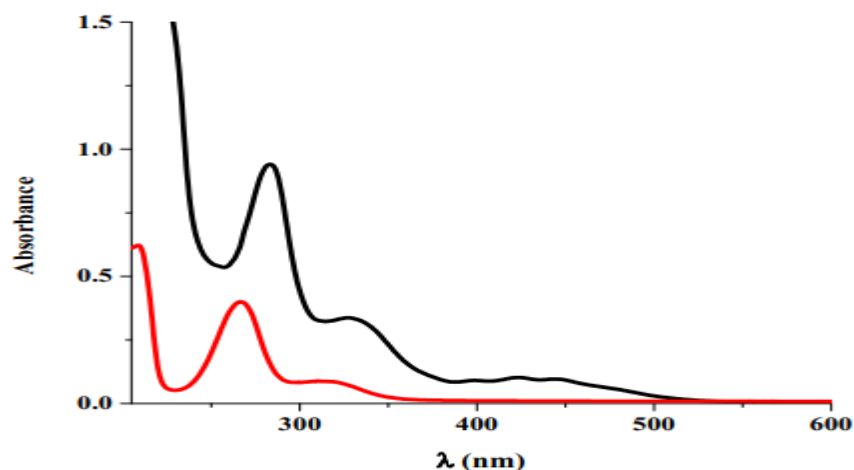


Figure 49: Spectre UV du naringine extrait (Ligne noire) et de naringine référence (Ligne rouge)

II.2. Évaluation In Vitro des activités biologiques :

II.2.1. Évaluation de l'activité antibactérien :

L'étude *in vitro* du pouvoir antimicrobien de naringine a été réalisée en utilisant la technique des disques de diffusion contre deux types de bactéries couramment rencontrées dans les infections, *Escherichia coli* (E. coli) et *Staphylococcus aureus* (S. aureus). Deux méthodes ont été utilisées pour évaluer l'activité antibactérienne : la mesure de la zone d'inhibition autour du disque imprégné de naringine, ainsi que la mesure de la densité optique de la suspension bactérienne après traitement avec différentes concentrations de naringine. Les résultats obtenus ont été comparés avec ceux de l'amoxicilline, un antibiotique couramment utilisé. Dans cette étude, nous présentons les résultats obtenus pour les différentes méthodes d'évaluation de l'activité antibactérienne de la naringine et leur comparaison avec l'amoxicilline.

II.2.1.1. Détermination du diamètre de la zone d'inhibition :

Après une incubation de 24 heures à 37°C, les zones d'inhibition entourant les disques imprégnés de naringine et d'amoxicilline ont été mesurées. Les photographies des zones d'inhibition obtenues pour les tests d'activité antibactérienne de naringine et d'amoxicilline contre *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* sont présentées ci-dessous (**Figure 50**). Les zones d'inhibition sont caractérisées par des zones claires dépourvues de croissance bactérienne autour des disques.



Zone d'inhibition de la naringine contre E. coli Zone d'inhibition de l'amoxicilline contre E. coli



Zone d'inhibition de naringine contre S. aureus Zone d'inhibition de l'amoxicilline contre S. aureus

Figure 50: Les photographies des zones d'inhibition obtenues pour les tests d'activité antibactérienne

Les diamètres des zones d'inhibition obtenus avec la naringine et l'amoxicilline contre E.coli et S.aureus sont résumés dans le **Tableau 8** suivant :

Tableau 8: Diamètre des zones d'inhibition de naringine et d'amoxicilline contre E. coli et S. aureus

Antibiotique	Bactérie	Diamètre de zone (mm)
Naringine	Escherichia coli	18.5
Amoxicilline	Escherichia coli	23.1
Naringine	Staphylococcus aureus	10.9
Amoxicilline	Staphylococcus aureus	20.2

Les résultats montrent que l'amoxicilline a un effet antimicrobien plus important que la naringine, avec des zones d'inhibition plus grandes pour les deux types de bactéries testées. Cependant, la naringine montre tout de même une activité antibactérienne significative, avec des zones d'inhibition de 10.6 à 18.5 mm contre E. coli et S. aureus.

II.2.1.2. Activités inhibitrice des bactéries (IC50) :

L'activité antibactérienne de la naringine a été étudiée en utilisant la méthode de mesure de l'absorbance pour calculer l'IC50. Cette méthode est basée sur la mesure de la croissance bactérienne dans des puits contenant différentes concentrations de naringine. Les résultats obtenus ont permis de déterminer la concentration minimale de naringine nécessaire pour inhiber la croissance bactérienne à 50 %.

Pour cela, des cultures de *E. coli* et de *S. aureus* ont été incubées avec différentes concentrations de naringine et d'amoxicilline allant de 1 à 17 mg/ml pendant 24 heures à 37°C. Ensuite, la densité optique de chaque échantillon a été mesurée à 620 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Les résultats obtenus sont résumés dans le **Tableau 9** suivants :

Tableau 9: Valeurs des absorbances tirées à partir du test antibactérien

Aringine			Amoxicilline		
C (mg/ml)	D.O.		C (mg/ml)	D.O.	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
0	2.742	2.742	0	2.742	2.742
1	2.439	2.308	0.01	2.117	1.954
2	2.351	2.222	0.02	1.718	1.816
3	2.333	2.219	0.04	1.658	1.626
4	2.256	2.028	0.08	1.103	1.389
5	2.169	2.026	0.16	0.828	1.344
6	2.153	2.018	0.31	0.677	0.868
7	2.144	1.923	0.63	0.638	0.21
8	2.133	1.916	1.25	0.395	0.197
9	2.103	1.841			
10	2.098	1.713			
11	2.07	1.659			
12	2.032	1.408			
13	1.981	1.228			
14	1.74	1.219			
15	1.684	1.158			

Le tableau présente les résultats de l'étude de l'activité antibactérienne de la naringine et de l'amoxicilline contre *E. coli* et *S. aureus* en utilisant la méthode de mesure de l'absorbance. Les résultats montrent que les densités optiques diminuent progressivement avec l'augmentation de la concentration de naringine ou d'amoxicilline, ce qui indique une réduction de la croissance bactérienne. Les valeurs de l'IC₅₀, qui représentent la concentration de naringine ou d'amoxicilline nécessaire pour inhiber 50% de la croissance bactérienne, ont été calculées à partir de ces données en traçant le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration des composés testés (**Figure51**), les valeurs des IC₅₀ obtenu sont présenté dans le **Tableau10**.

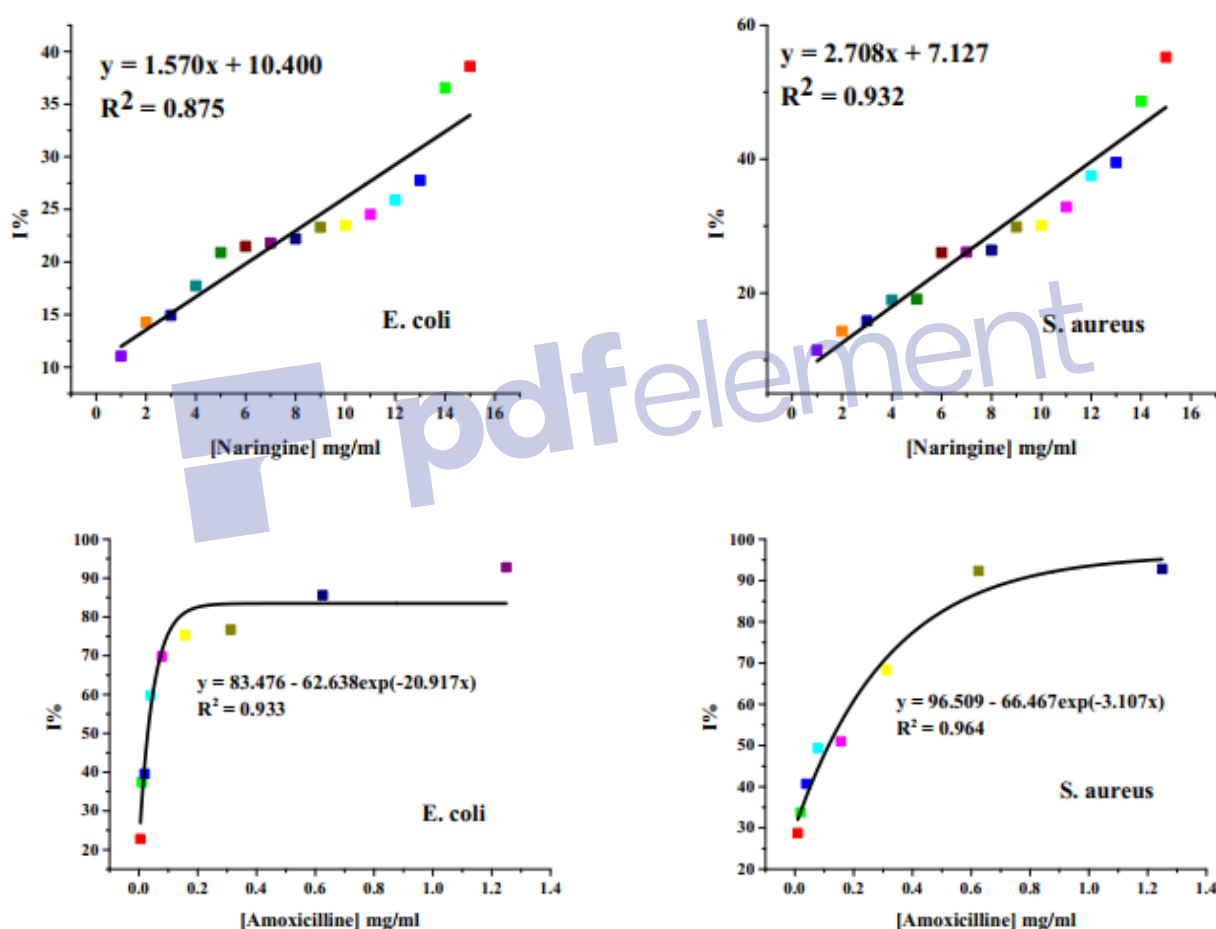


Figure 51: Les courbes de régression linéaire de pourcentage d'inhibition des bactéries en fonction de la concentration de Naringine et Amoxicilline

Tableau 10 Activité antibactérien de naringine et amoxicilline par le test d'inhibition de *E. coli* et *S. aureus*

Naringine		Amoxicilline	
<i>I%</i> (<i>E. coli</i>)	<i>I%</i> <i>S. aureus</i>	<i>I%</i> <i>E. coli</i>	<i>I%</i> <i>S. aureus</i>
11.050	11.451	22.794	28.738
14.260	14.296	37.345	33.771
14.916	15.828	39.533	40.700
17.724	18.964	59.774	49.344
20.897	19.074	69.803	50.985
21.481	26.039	75.310	68.344
21.809	26.112	76.732	92.341
22.210	26.404	85.594	92.815
23.304	29.869	IC50 = 0.059 mg/ml IC50 = 0.115 mg/ml	
23.487	30.124		
24.508	32.859		
25.894	37.527		
27.753	39.497		
36.543	48.651		
38.585	55.215		
IC50 = 5.25 mg/ml IC50 = 6.18 mg/ml			

Les résultats présentent les inhibitions de la croissance de bactéries *E. coli* et *S. aureus* en présence de naringine et d'amoxicilline. Les résultats montrent que l'efficacité de la naringine est relativement faible comparée à celle de l'amoxicilline, avec des IC50 de 5.25 mg/ml et 6.18 mg/ml respectivement.

En ce qui concerne la naringine, les résultats montrent une inhibition de la croissance de bactéries allant jusqu'à 27.75 % pour *E. coli* et 55.21 % pour *S. aureus*, à la concentration la plus élevée testée (23.304 mg/ml). Cela suggère que la naringine peut avoir une certaine activité antimicrobienne, bien que cela nécessite des concentrations relativement élevées.

En revanche, les résultats de l'amoxicilline montrent une inhibition de la croissance bactérienne allant jusqu'à 92.81 % pour *S. aureus* à la concentration la plus élevée testée (0.115

mg/ml). Cela confirme l'efficacité bien connue de l'amoxicilline en tant qu'antibiotique contre les infections bactériennes.

II.2.1.3. Constantes de liaison

La méthode de mesure de l'absorption spectrophotométrique a été utilisée pour évaluer la constante de liaison (K_b) du naringine avec les deux types de bactérie. Cette constante a été exprimée en M^{-1} . Les concentrations décroissantes de naringine et d'amoxicilline ont entraîné une diminution progressive de l'absorption de la solution contenant la bactérie. En traçant un graphique de $A/(A_0-A)$ en fonction de $1/C$ (**Figure 52**), la pente a été calculée comme étant $\varepsilon/(\varepsilon_0-\varepsilon)K_b$, où ε représente l'absorbance de la solution contenant le composé, et ε_0 l'absorbance de la solution de contrôle. L'intersection "y" a également été calculée comme étant $\varepsilon/(\varepsilon_0-\varepsilon)$. La constante de liaison a ensuite été obtenue en divisant la pente par l'intersection ($K_b = \text{pente}/\text{intersection}$).

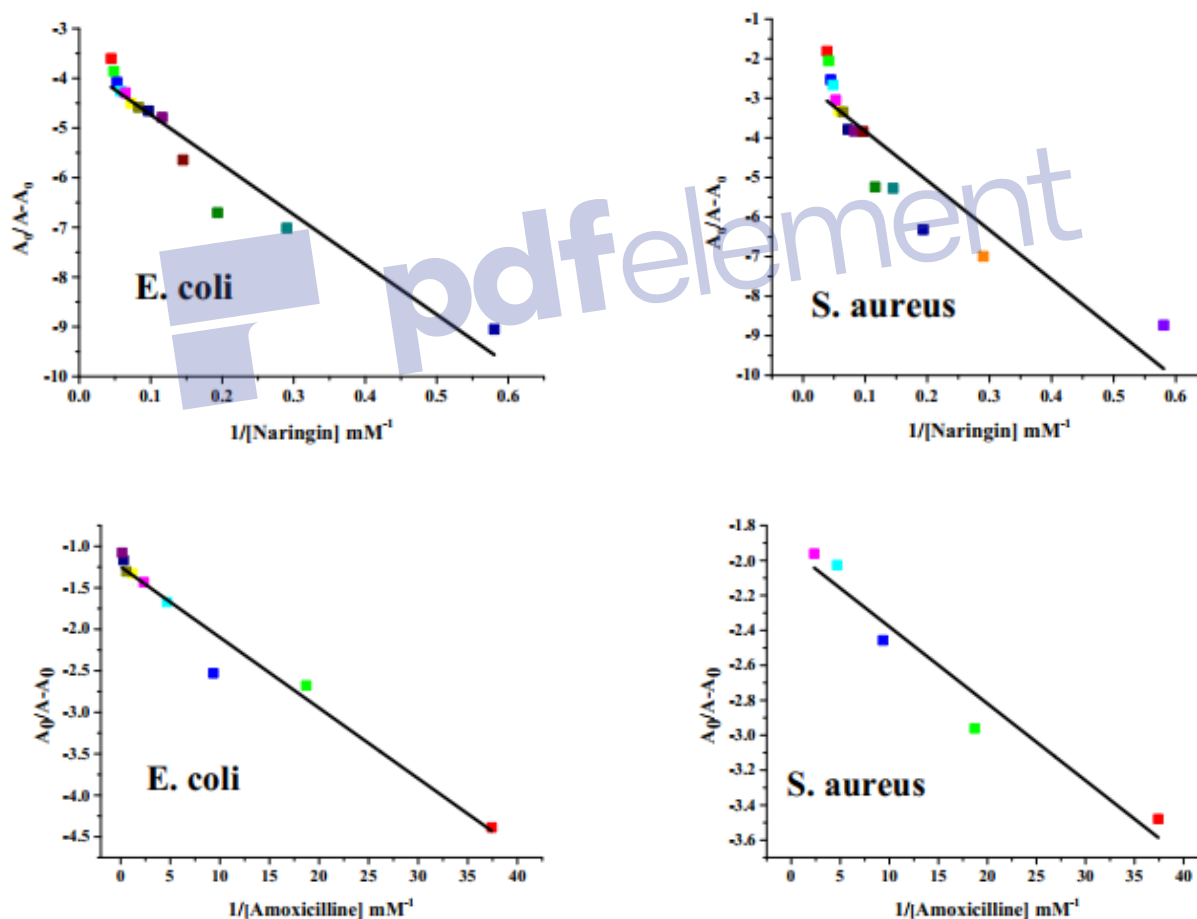


Figure 52: Tracés des courbes de $A/(A_0 - A)$ en fonction de $1/[Naringine]$ et $1/[Amoxicilline]$ utilisées pour calculer les constantes de liaison

II.2.1.4. Énergie libre de liaison :

En utilisant l'Équation 5, nous avons pu calculer la variation de l'énergie libre de liaison. Les valeurs négatives de ΔG indiquent que l'interaction entre les bactéries en question et les composés étudiés est spontanée, tandis que leur magnitude indique une forte liaison entre la protéine et les ligands. Les constantes de liaison et les énergies libres de liaison correspondantes sont résumées dans le **Tableau 11**.

Tableau 11 : Constantes de liaison et énergies libres de liaison pour Naringine et Amoxicilline avec les deux types des bactéries calculées à partir des données UV-Vis.

Adduits	Équations	R ²	K (M ⁻¹)	-ΔG (KJ.mol ⁻¹)
Naringine_Escherichia coli	y = -10.050x - 3.728	0.918	3.70 × 10 ⁵	31.79
Naringine _Staphylococcus aureus	y = -28.854x - 1.224	0.920	4.24 × 10 ⁴	26.42
Amoxicilline_Escherichia coli	y = -0.085x - 1.247	0.962	1.46 × 10 ⁴	23.78
Amoxicilline_Staphylococcus aureus	y = -0.044x - 1.939	0.933	4.40 × 10 ⁴	26.51

Les résultats montrent que les valeurs de R² sont supérieures à 0.9 pour toutes les équations, indiquant une bonne corrélation entre les concentrations des composés et leur interaction avec les protéines. Les valeurs de K (constante de liaison) pour le naringine sont significativement plus élevées que pour l'amoxicilline, ce qui indique une forte liaison entre le naringine et les bactéries étudiées. De plus, les valeurs négatives de ΔG indiquent que l'interaction est spontanée et que la liaison entre les composés et les protéines est forte.

Il est intéressant de noter que la naringine présente une liaison plus forte avec les deux souches bactériennes étudiées, ce qui suggère qu'elle pourrait être un agent

antibactérien potentiel. En revanche, l'amoxicilline montre une liaison plus faible avec les deux souches bactériennes, ce qui est cohérent avec le fait que cette molécule est un antibiotique couramment utilisé et que les bactéries peuvent développer une résistance à son action.

II.3. Évaluation *In Silico* des activités biologiques :

II.3.1. Évaluation de l'activité biologique par amarrage moléculaire :

L'amarrage moléculaire est une méthode informatique qui permet de prédire l'interaction entre une molécule cible et un ligand potentiel (Vijesh et al. 2013). Cette méthode est couramment utilisée en chimie médicinale pour découvrir de nouveaux médicaments ou pour optimiser la conception de molécules existantes (Hanane and Ahlam 2016). Les résultats de l'amarrage moléculaire peuvent fournir des informations sur la force et la nature de l'interaction entre le ligand et la cible, ainsi que sur la conformation du complexe ligand-cible (Pinzi and Rastelli 2019). Dans cette étude, et afin de confirmer les résultats expérimentaux nous allons discuter des résultats obtenus par amarrage moléculaire pour différentes activités biologiques

II.3.1.1. Évaluation de l'activité antibactérien :

Afin de confirmer l'activité antibactérienne expérimentalement mesurée contre *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*, une étude in-silico par amarrage moléculaire a été réalisée sur les protéines des bactéries en question. L'objectif de cette étude était de prédire les interactions moléculaires entre le composé d'intérêt et les bactéries étudiés, et d'évaluer leur potentiel antibactérien en utilisant le logiciel AutoDock. En outre, une comparaison des résultats obtenus avec l'amoxicilline, un antibiotique communément utilisé, a été effectuée.

Les résultats ont montré que l'amoxicilline avait une forte affinité de liaison contre le staphylococcus, avec une énergie de liaison significative (-27.21 KJ/mol). De plus, le naringine a également montré une affinité de liaison élevée avec l'*E. coli*, avec une énergie de liaison de -28.34 KJ/mol. Ces résultats suggèrent que le composé pourrait avoir un potentiel antibactérien similaire ou mieux à celui de l'amoxicilline et peuvent servir de base pour le développement de nouveaux agents thérapeutiques. Les détails des résultats d'interaction sont présentés dans le **Tableau 12**.

Tableau 12: Les paramètres de liaison obtenu par amarrage moléculaire de naringine et amoxicilline avec l'E. coli et le S. aureus

Adduits	Type de liaison	Acide Aminé	Distance (Å)	-ΔG (KJ.mol ⁻¹)	IC ₅₀ (μM)
Naringine_Escherichia coli	Interaction Hydrophobique	ASN 46	3.93	28.34	10.74
		ARG 76	3.40		
		ILE 78	3.96		
	Liaison Hydrogène	ASN 46	3.43		
		ASP 49	2.75		
		ASP 49	4.08		
		GLU 50	2.58		
		GLU 50	2.84		
		ASP 73	3.66		
		ARG 76	3.06		
		GLY 77	2.96		
		THR 165	3.48		
	π-Cation	ARG76	3.86		
Amoxicilline_Escherichia coli	Interaction Hydrophobique	ASP 49	3.24	20.06	303.54
		GLU 50	3.38		
		ILE 78	3.36		
	Liaison Hydrogène	ASN 46	2.63		
		ASN 46	3.01		
		ASP 49	2.56		
		ASP 9	3.43		
		GLU 50	2.75		
		ARG 76	2.85		
	Ponts de sel	ARG 76	5.42		
Naringine_Staphylococcus aureus	Interaction Hydrophobique	THR 165	3.50	27.04	15.51
		LYS 197	3.17		
	Liaison Hydrogène	TYR 37	4.03		
		TYR 37	4.03		
		GLN 38	3.87		
		GLY 86	3.85		
		THR 164	2.68		
		TYR 216	2.89		
		ASN 242	2.97		

Amoxicilline_Staphylococcus aureus		ASP 244	3.02	27.21	18.11
	π -Cation	LYS 197	4.74		
	Interaction Hydrophobique	TYR 37	3.37		
	Liaison Hydrogène	GLN 38	3.91		
		VAL 87	3.58		
		THR 198	3.10		
		THR 198	3.04		
		TYR 216	2.71		
		TYR 216	2.74		
		GLN 218	4.05		
		GLN 218	2.68		
		ASN 242	3.69		
		ASP 244	2.71		
	π -Empilement	TYR 216	5.12		

l'ASP 244. De plus, une interaction π -cationa été observée avec le LYS 197. Pour l'amoxicilline, des interactions hydrophobes ont été observées avec le TYR 37, et des liaisons hydrogène avec le GLN 38, le VAL 87, le THR 198, le TYR 216, le GLN 218, l'ASN 242 et l'ASP 244. De plus, une interaction π -empilement a été observée avec le TYR 216.

L'IC₅₀ est un indicateur important de l'activité inhibitrice d'un composé sur une cible biologique. Dans les résultats présentés, on peut voir que le naringine et l'amoxicilline ont des valeurs d'IC₅₀ différentes pour chaque cible bactérienne. Le naringine présente une IC₅₀ plus faible pour E. coli que pour S. aureus, ce qui peut suggérer que ce composé a une activité antibactérienne plus forte contre E. coli que contre S. aureus. De même, l'amoxicilline a une IC₅₀ plus faible pour S. aureus que pour E. coli, ce qui peut indiquer que ce composé est plus efficace contre S. aureus que contre E. coli. Cependant, il convient de noter que les résultats obtenus par amarrage moléculaire sont en accord avec ce qui obtient expérimentalement par la méthode spectroscopique.

Les photographies de l'interaction des composés étudiées avec l' α -amylase sont présentés dans les **Figures 53-56** suivants :

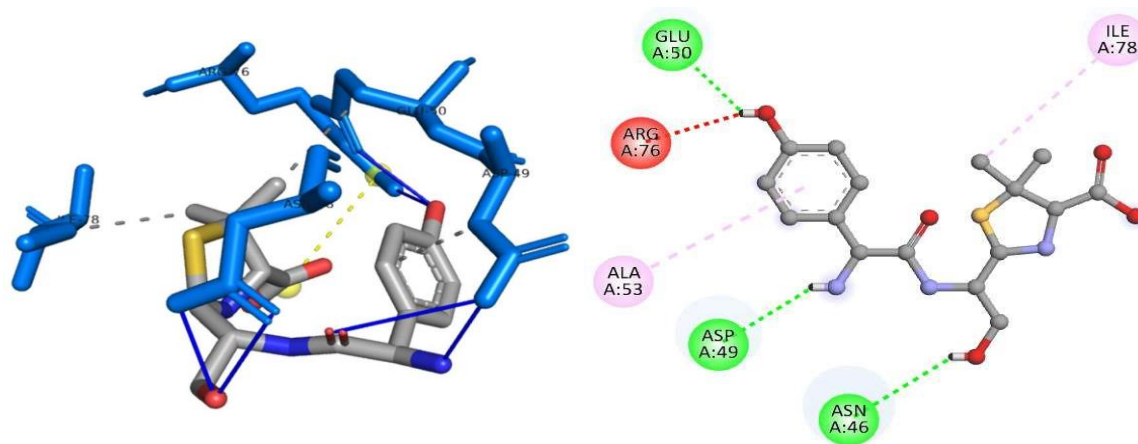


Figure 53 : Présentation 2D et 3D du ligand naringine avec l'E. coli

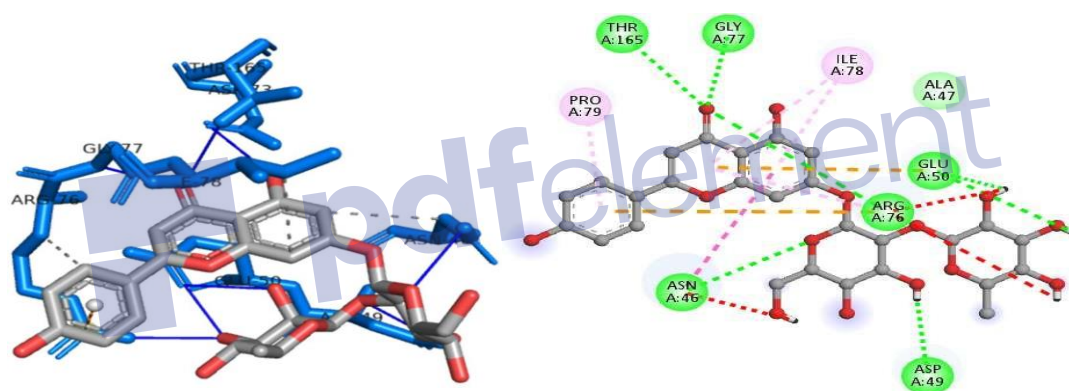


Figure 54 : Présentation 2D et 3D du ligand amoxicilline avec l'E. coli

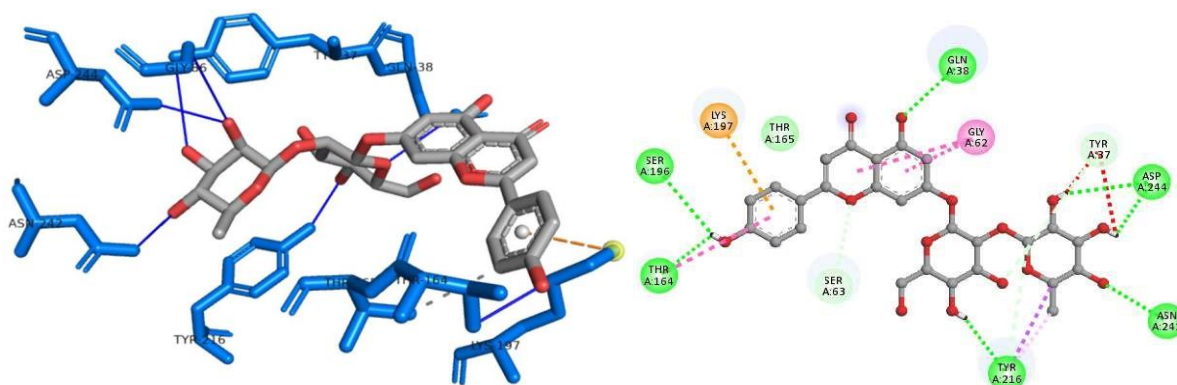


Figure55: Présentation 2D et 3D du ligand naringine avec le S. aureus

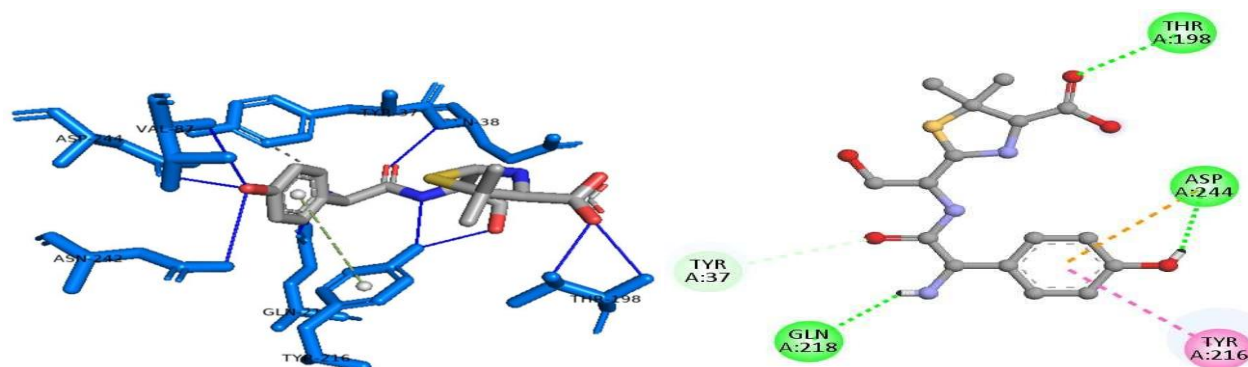


Figure 56: Présentation 2D et 3D du ligand amoxicilline avec le *S. aureus*

Le **Tableau 13** fournit une analyse comparative approfondie des valeurs d'énergie de liaison et d'IC₅₀ obtenues par des approches expérimentales *in vitro* et par amarrage moléculaire *in-silico*, permettant ainsi d'évaluer la concordance entre les résultats obtenus par ces deux méthodes et d'apporter des informations importantes sur la validité et la fiabilité des simulations *in-silico* dans l'étude des interactions moléculaires.

Table 13: Comparaison des paramètres de liaison et d'IC₅₀ pour les activités biologiques obtenu par UV et amarrage moléculaire.

Technique			UV-Vis			Amarrage moléculaire		
			IC ₅₀	K	-ΔG	IC ₅₀	K	-ΔG
			(μM)	(M ⁻¹)	(KJ.mol ⁻¹)	(μM)	(M ⁻¹)	(KJ.mol ⁻¹)
Antibactérien	E. coli	Naringine	9 × 10 ³	3.70 × 10 ⁵	31.79	10.74	9.21 × 10 ⁴	28.34
		Amoxicilline	161.5	1.46 × 10 ⁴	23.78	303.54	3.26 × 10 ³	20.06
	S. aureus	Naringine	10 × 10 ³	4.24 × 10 ⁴	26.42	15.51	5.45 × 10 ⁴	27.04
		Amoxicilline	314.7	4.40 × 10 ⁴	26.51	18.11	5.84 × 10 ⁴	27.21

La comparaison entre les résultats obtenus par les tests *in vitro* (UV-Vis) et *in-silico* (amarrage moléculaire) dans le **Tableau 13** peut fournir des informations intéressantes sur la corrélation entre les données expérimentales et les prédictions basées sur la modélisation moléculaire.

Dans le cas de la naringine, les résultats montrent que les valeurs d'IC₅₀ obtenues par les tests *in vitro* varient de 6.02 μM à 10 × 10³ μM, tandis que les valeurs d'IC₅₀ prédites par l'amarrage moléculaire *in-silico* varient de 2.48 μM à 3.03 × 10² μM. On observe donc une différence notable entre les deux méthodes, avec des valeurs d'IC₅₀ généralement plus élevées obtenues par l'amarrage moléculaire *in-silico* par rapport aux tests *in vitro*.

De plus, les valeurs de K (constante de dissociation) et de ΔG (énergie libre de liaison) obtenues par l'amarrage moléculaire *in-silico* sont en bon accord avec celles mesurées par les tests *in vitro*. Cela peut s'expliquer par les bonnes approximations inhérentes à chaque méthode. Les tests *in vitro* peuvent prendre en compte des interactions complexes entre la molécule testée et les cibles biologiques dans un environnement biologique réel, mais ils peuvent également être influencés par des facteurs expérimentaux tels que la pureté des échantillons, les conditions de test et la variabilité biologique (Tokath et al. 2015). En revanche, l'amarrage moléculaire *in-silico* est basé sur des modèles mathématiques et des simulations informatiques (Terstappen and Reggiani et al. 2001), ce qui peut entraîner des approximations et des simplifications dans la prédiction des interactions moléculaires.

Il est important de noter que les résultats obtenus par les tests *in vitro* et *in-silico* sont complémentaires et peuvent fournir des informations utiles dans la compréhension des propriétés pharmacologiques des molécules étudiées (Di Ventura et al. 2006). Les résultats expérimentaux *in vitro* peuvent valider les prédictions *in-silico* et fournir des données plus proches des conditions biologiques réelles, tandis que l'amarrage moléculaire *in-silico* peut aider à la conception de nouvelles molécules et à la compréhension des interactions moléculaires à un niveau atomique (Trujillo-Correa et al. 2019).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES



Conclusion

L'utilisation des plantes médicinales en phytothérapie a reçu un grand intérêt dans la recherche biomédicale et devient aussi importante que la chimiothérapie. Ce regain d'intérêt vient d'une part du fait que les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances et de composés naturels bioactifs et d'autre part du besoin de la recherche d'une meilleure médication par une thérapie plus douce sans effets secondaires.

Dans le présent travail, nous nous sommes intéressés aux effets antibactériens d'extrait(naringine) de la plantes d'orange de la région d'Eloued .

Les microorganismes choisis dans ce travail (Staphylococcus aureus, Escherichia coli,) qui sont bien désignées comme des agents cliniques et épidémiologiques ont été identifiées grâce à des méthodes microbiologiques standardisées (caractères morphologique et biochimiques) ce qui nous a permet de confirmer la pureté de ces souches.

Une recherche supplémentaire sur la composition chimique d' extrait (naringine) est plus que nécessaire pour pouvoir évaluer avec précision l'activité antimicrobienne , et d'explorer d'autres activités thérapeutiques de cette plante in vitro et in silico.

De ce fait, les perspectives envisagées pour cette étude sont les suivantes:

- Caractérisation des molécules impliquées dans les effets antibactériens des à l'aide d'outils moléculaires (méthodes de séparation biochimiques) tel que les techniques : HPLC,CCM,UV-visible, IR.
- Le rendement d'extraction moyen pour le naringine était de 2%
- les zones d'inhibition entourant les disques imprégnés de naringine et d'amoxicilline ont été mesurées.
- fournit une analyse comparative approfondie des valeurs d'énergie de liaison et d'IC50 obtenues par des approches expérimentales in vitro et par amarrage moléculaire in- silico.

Ce mémoire a porté sur la caractérisation de la naringine, et son activité biologique in vitro ainsi que sa prédiction in-silico par amarrage moléculaire. Les résultats ont montré que la naringine possède plusieurs activités biologiques intéressantes, notamment antibactérien, ce qui en fait un composé potentiellement utile pour la médecine et la pharmacologie.

La naringine a montré une activité antibactérienne contre *E. coli* et *S. aureus*. Ces résultats suggèrent que la naringine a un potentiel thérapeutique important pour le traitement de diverses maladies.

Les prévisions de toxicité ont montré que la naringine était peu toxique, ce qui renforce son potentiel en tant que composé thérapeutique. Les résultats de cette étude pourraient aider à orienter les recherches futures sur l'utilisation de la naringine en tant que médicament potentiel pour le traitement de diverses maladies.



Perspectives

Les résultats de cette étude ont ouvert de nouvelles perspectives de recherche sur l'utilisation de naringine pour le traitement de maladies telles que infections bactériennes. Des études complémentaires pourraient être menées pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents de l'activité biologique de la naringine, notamment l'effet sur d'autres enzymes impliquées dans ces maladies.

En outre, l'étude de la structure de naringine pourrait être approfondie pour améliorer sa bioactivité en concevant des analogues de naringine plus efficaces. Les méthodes in-silico pourraient être utilisées pour prédire l'activité biologique de ces analogues avant leur synthèse et leur test in vitro. Des études cliniques pourraient également être envisagées pour évaluer l'efficacité de la naringine chez l'homme et pour établir une dose thérapeutique optimale.

Enfin, étant donné que l'étude a également révélé des résultats prometteurs pour l'utilisation de la naringine comme agent antibactérien contre *E. coli* et *S. aureus*, il serait intéressant d'explorer davantage son potentiel en tant qu'agent antibactérien dans des modèles in vivo.



REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Abu-Darwish**, M. S., **Al-Ramamneh**, E. A., **Kyslychenko**, V. S., & **Karpiuk**, U. V. (2012). The antimicrobial activity of essential oils and extracts of some medicinal plants grown in Ashshoubak Region-South of Jordan. *Pak J Pharm Sci*, 25(1), 239-46.
- **ADIKO Marcelline**, **BOUTTIER Sylvie**, **Okpekon Timothée Aboua**, **LAMBERT Sylvie**, **AKESSI Laurent**, **KABLAN Brou Jérôme** et **CHAMPY Pierre**. Phytothérapie traditionnelle des conjonctivites en milieu urbain ivoirien : enquête sur les deux marchés aux plantes médicinales d'Abidjan. *Acta Botanica Gallica: Botany Letters*, 2014, vol 161, no 1, p33–45.
- **Ahuja A**, **Bakshi S K**, **Sharma S K**, **Thappa R K**, **Agarwal S G**, **Kichlu S K**, **Paul R** and **Kaul M K** (2005). Production of volatile terpenes by proliferating shoots and micropropagated plants of *Santolina chamaecyparissus* L. (cotton lavender). *Flavour Fragrance Journal*, 20, 403-406.
- **Akerreta S**, **Cavero R Y**, **López V** and **Calvo M I** (2007). Analyzing factors that influence the folk use and phytonomy of 18 medicinal plants in Navarra. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 3 (16), 1-18.
- **AL-SNAFI Ali Esmail**. Antiparasitic effects of medicinal plants (part 1)- A review. *IOSR Journal of Pharmacy*, 2016, vol 6, no 10, p 51-66.
- and radical-scavenging activities of certain radioprotective plant extract. *Food Chemistry*. 106: 868-873.
- applications. Cambridge: Woodhead Publishing Limited. New York, USA p. 108-109. **Barrero A F**, **Mar Herrador M**, **Quilez J F**, **Alvarez- Manzaneda R**, **Portal D**, **Gavin J A**, **Gravalos D G**, **Simmonds M S J** and **Blaney W M** (1999). Bioactive sesquiterpenes from *Santolina rosmarinifolia* subsp. *Canescens*. A conformational analysis of the germacrane ring. *Phytochemistry*, 51, 529-541.
- **BRUNETON, J.**1993, Pharmacognosie. Phytochimie, plantes médicinales. 2ème édition, Tec & Doc. Lavoisier. Paris, 915p
- **Cavero R.Y.**, **Akerreta S.**, **Calvo M.I.** Pharmaceutical ethnobotany in the Middle Navarra (Iberian Peninsula). *J. Ethnopharmacol.* 137, 844-855 (2011)
- **CHIRANE Manel Soumia*1**, **BENCHABANE Otman2**, **BOUSBIA Nabil3** and **ZENIA Safia1** (2019), ANTIOXYDANT AND ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF ESSENTIAL OIL AND ETHANOL EXTRACT OF *SANTOLINA CHAMAECYPARISSUS* L.

- Christensen L P (1992). Acetylenes and related compounds in Anthemideae. *Phytochemistry*, 31, 7-49.
- Da Silva J A T (2004). Mining the essential oils of the Anthemidea. *African Journal of Biotechnology*, 3 (12), 706-720.
- Dalila Messaoudi Hamama Bouriche Ibrahim Demirtas Abderrahmane Senator (2018), *Phytochemical Analysis and Hepatoprotective, Activity of Algerian Santolina chamaecyparissus L. Extracts* 20 mars
- Dalila Messaoudi Hamama Bouriche Ibrahim Demirtas Abderrahmane Senator (2018), *Phytochemical Analysis and Hepatoprotective, Activity of Algerian Santolina chamaecyparissus L. Extracts* 20 mars
- Derbesy M, Touche J and Zola A (1989). The essential oil of *Santolina chamaecyparissus L.*
- *Journal of Essential Oil Research*, 1, 269-275.
- Ferrari B, Tomi F and Casanova J (2005). Terpenes and acetylene derivatives from the roots of *Santolina corsica* (Asteraceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 33, 445-449.
- Hussein, H. J., Hadi, M. Y., & Hameed, I. H. (2018). Cytotoxic Activity of *Thymus vulgaris*: Antibacterial and Antifungal Activity. *International Journal of Pharmaceutical Quality Assurance*, 9(02), 166-169.
- ISERIN Paul. *Larousse encyclopédie des plantes médicinales. Identification, Préparations, Soins.* 2eme edition, Dorling Kindersley Limited, Londres. 2001.
- JORITE sophia. *La Phytothérapie, une discipline entre passé et futur : de l'herboristerie aux pharmacies dédiées au naturel [en ligne].* 2015. Thèse de doctorat, Université Bordeaux 2,
- U.F.R Des sciences pharmaceutiques.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Principes méthodologiques généraux pour la recherche et l'évaluation relatives à la médecine traditionnelle.* Genève: Organisation mondiale de la Santé, 2000.
- Pariente L. (2001) *Dictionnaire des sciences pharmaceutique et biologique.* 2ème Ed. Académie nationale de pharmacie. Paris 1643 p.
- Tisserand M, 2014, *Aromatherapy vs MRSA: Antimicrobial essential oils to combat bacterial infection, including the superbug.* Singing Dragon, 192p
- Pietta P, Gardana C et Pietta A 2003. *Flavonoids in Herbs.* In: Rice-Evans CA et Packer L (éd) *Flavonoids in Health and Disease.* Marcel Dekker, New York, pp. 43- 69.

- Gattuso G. et al 2007, Flavonoid Composition of Citrus Juices, *Molecules*.12 ;1641- 1673.
- Ardhaoui M, Falcimaigne A, Engasser JM, Moussou P, Pauly G, Ghoul M 2004. Acylation of natural flavonoids using lipase of *Candida antarctica* as biocatalyst. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 29: 63–67.
- Tusa N, Abbate L, Renda A et Ruberto G 2007. Polyphenols Distribution in Juices from Citrus Allotetraploid Somatic Hybrids and Their Sexual Hybrids. *Journal of Agricultural and food chemistry*. 55 : 9089-9094.
- Portet B 2007. (doctorat) Recherche Bioguidée de Molécules Antipaludiques d'une Plante Guyanaise *Piper hostmannianum* var. *berbicense*. Université Paul Sabatier Toulouse III, France.
- Hadj salem J 2009. (doctorat) Extraction, Identification, Caractérisation des Activités Biologiques de Flavonoïdes de *Nitraria Retusa* et Synthèse de Dérivés de ces Molécules par Voie Enzymatique. Institut National Polytechnique de Lorraine, France.
- Marais JJ, Deavours B, Dixon RA et Ferreira D 2006. The Stereochemistry of Flavonoids. In: Grotewold E (éd) *The Science of Flavonoids*. Springer, US, pp. 01-46;
- Prottogente AR, Rice-Evans CA, Wiseman S et van de Put FHMM 2003. The Relationship Between the Phenolic Composition and the Antioxidant Activity of Fruits and Vegetables. In: Rice-Evans CA et Packer L (éd) *Flavonoids in Health and Disease*. Marcel Dekker, New York, pp. 71-95.
- Salas MP, Céliz G, Geronazzo H, Daz M et Resnik SL 2011. Antifungal activity of natural and enzymatically-modified flavonoids isolated from citrus species. *Food Chemistry*. 124 : 1411–1415.
- Orallo F, Álvarez E, Basaran H, Lugnier C (2004) Comparative study of the vasorelaxant activity, superoxide-scavenging ability and cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitory effects of hesperetin and hesperidin. *Naunyn- Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 370: 452–463.
- Ishii K, Ishii K, Furuta T, Kasuya Y 1997 Determination of naringin and naringenin in human urine by highperformance liquid chromatography utilizing solid-phase extraction. *Journal of Chromatography B*(704): 299–305.
- Aturki Z, Randi V et Sinibaldi M 2004. Separation of Flavanone-7-O-glycoside Diastereomers and Analysis in Citrus Juices by Multidimensional Liquid Chromatography Coupled with Mass Spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry*. 52: 5303-5308.

- Ardhaoui M, Falcimaigne A, Engasser JM, Moussou P, Pauly G, Ghoul M 2004. Acylation of natural flavonoids using lipase of candida antarctica as biocatalyst. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 29: 63–67.
- Tusa N, Abbate L, Renda A et Ruberto G 2007. Polyphenols Distribution in Juices from Citrus Allotetraploid Somatic Hybrids and Their Sexual Hybrids. *Journal of Agricultural and food chemistry*. 55 : 9089-9094.
- Portet B 2007. (doctorat) Recherche Bioguidée de Molecules Antipaludiques d'une Plante Guyanaise Piper hostmannianum var. berbicense. Université Paul Sabatier Toulouse III, France.
- Hadj salem J 2009. (doctorat) Extraction, Identification, Caractérisation des Activités Biologiques de Flavonoïdes de Nitraria Retusa et Synthèse de Dérivés de ces Molécules par Voie Enzymatique. Institut National Polytechnique de Lorraine, France.
- Marais JJ, Deavours B, Dixon RA et Ferreira D 2006. The Stereochemistry of Flavonoids. In: Grotewold E (éd) *The Science of Flavonoids*. Springer, US, pp. 01-46;
- Proteggente AR, Rice-Evans CA, Wiseman S et van de Put FHMM 2003. The Relationship Between the Phenolic Composition and the Antioxidant Activity of Fruits and Vegetables. In: Rice-Evans CA et Packer L (éd) *Flavonoids in Health and Disease*. Marcel Dekker, New York, pp. 71-95.
- Koh E et Mitchell AE 2006. Trends in the Analysis of Phytochemicals: Flavonoids and Carotenoids. In: Meskin MS, Bidlack WR et Randolph RK (éd) *Phytochemicals: Aging and Health*. CRC Press, Boca Raton, US, pp. 39-76.
- Davies KM et Schwinn KE 2006. Molecular Biology and Biotechnology of Flavonoid Biosynthesis. In: Andersen ØM et Markham KR (éd) *Flavonoids : Chemistry, Biochemistry and Applications*. CRC Press, Boca Raton, US, pp. 143-218.
- Orallo F, Álvarez E, Basaran H, Lugnier C (2004) Comparative study of the vasorelaxant activity, superoxide-scavenging ability and cyclic nucleotide phosphodiesteraseinhibitory effects of hesperetin and hesperidin. *Naunyn- Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 370: 452–463.
- Ishii K Ishii K, FurutabT, KasuyaY 1997 Determination of naringin and naringenin in human urine by highperformance liquid chromatography utilizing solid-phase extraction. *Journal of Chromatography B(704)*: 299–305.
- Koh E et Mitchell AE 2006. Trends in the Analysis of Phytochemicals: Flavonoids and

- Carotenoids. In: Meskin MS, Bidlack WR et Randolph RK (éd) *Phytochemicals: Aging and Health*. CRC Press, Boca Raton, US, pp. 39-76.
- Davies KM et Schwinn KE 2006. *Molecular Biology and Biotechnology of Flavonoid Biosynthesis*. In: Andersen ØM et Markham KR (éd) *Flavonoids : Chemistry, Biochemistry and Applications*. CRC Press, Boca Raton, US, pp. 143-218.
 - Chebil L 2006. (doctorat) *Acylation des flavonoïdes par les lipases de Candida antarctica et de Pseudomonas cepacia : études cinétique, structurale et conformationnelle*. Institut National Polytechnique de Lorraine, France ;
 - Poaty-Poaty B 2009. (doctorat) *Modification Chimique d'Antioxydants pour les Rendre Lipophiles : Application aux Tannins*. Université Henri Poincaré – Nancy I, France.
 - Kanaze FI, Bounartzi MI, Georgarakis M et Niopas I 2007. Pharmacokinetics of the citrus flavanone aglycones hesperetin and naringenin after single oral administration in human subjects. *European Journal of Clinical Nutrition*. 61 : 472–477.
 - GuoaD, WangaJ, WangaX. , LuoH , ZhangaH, CaoD, Chena L, HuangN, 2011 Double directional adjusting estrogenic effect of naringin from *Rhizomadrynariae* (Gusuibu). *Journal of Ethnopharmacology*(138):451– 457.
 - Ye XQ, Chen JC, Liu DH, Jiang P, Shi J, Xue S, Wu D, Xu JG et Kakuda Y 2001. Identification of bioactive composition and antioxidant activity in young mandarin fruits. *Food Chemistry*. 124: 1561–1566.
 - Coll MD, Coll L, Laencina J et Tomás-Barberáán FA 1997. Recovery of flavanones from wastes of industrially processed lemons. *Z Lebensm Unters Forsch A*. 206: 404- 407;
 - Angert, E. R., Clements, K. D. & Pace, N. R. (1993). The largest bacterium. *Nature* 362, 239–241.
 - Bantegnies, C., Cotten, A., Hue, V. & Rodriguez, R. (2010). Chapitre 3 : Compléments pour en savoir plus - SVT Blaye.
 - Bergey, D. H. & Holt, J. G. (Eds.). (2000). *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 9. ed., [Nachdr.]. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
 - Black, J. G. (2012). *Microbiology: Principles and Explorations*, 8 edition. Wiley.
 - Madigan, M. & Martinko J. (2007). *Brock. Biologie des micro-organismes*, 11ème édition.
 - Cano, R. J. & K. (Borucki, M 1995). Revival and identification of bacterial spores in 25- to 40-million-year-old Dominican amber. *Science* 268, 1060–1064.

- Fabretti, F., Theilacker, C., Baldassarri, L., Kaczynski, Z., Kropec, A., Holst, O. & Huebner, J. (2006). Alanine esters of enterococcal lipoteichoic acid play a role in biofilm formation and resistance to antimicrobial peptides. *Infect Immun* 74, 4164–4171.
- Genty, C. (2013). Téléchargement schéma et photos d'un microscope optique et de ses différentes parties - Intellego.fr.
- Heidelberg, J. F., Eisen, J. A., Nelson, W. C., Clayton, R. A., Gwinn, M. L., Dodson, R. J., Haft, D. H., Hickey, E. K., Peterson, J. D. & other authors. (2000). DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature* 406, 477–483.
- Höltje, J. V. (1998). Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* MMBR 62, 181–203.
- Jett, B. D., Huycke, M. M. & Gilmore, M. S. (1994). Virulence of enterococci. *Clin Microbiol Rev* 7, 462–478.
- Julio, A. (2015). Bactéries : anatomie fonctionnelle et classification médicale.
- Ladjouzi, R. (2013). Analyse des mécanismes de tolérance aux antibiotiques ciblant la paroi chez les entérocoques. Université de Caen Basse-Normandie.
- Meyer, A., Deiana, J. & Leclerc, H. (2000). Cours de microbiologie générale: nouveau programme. Paris: Doin.
- Prescott, L. M., Harley, J. P. & Klein, D. A. (2003). Microbiologie. De Boeck.
- Prescott, L. M., Willey, J. M., Sherwood, L., Woolverton, C. J. & Prescott, L. M. (2013). Microbiologie. De Boeck 4ème édition.
- Prieur, D., Geslin, C. & Payan, C. (2011). Mini manuel de microbiologie: cours + QCM-QROC. Paris: Dunod.
- Roujeinikova, A. (2008). Crystal structure of the cell wall anchor domain of MotB, a stator component of the bacterial flagellar motor: Implications for peptidoglycan recognition. *Proc Natl Acad Sci* 105, 10348–10353.
- Schleifer, K. H., Kilpper-Bälz, R., Kraus, J. & Gehring, F. (1984). Relatedness and classification of *Streptococcus mutans* and 'mutans-like' streptococci. *J Dent Res* 63, 1047–1050.
- Schulz, H. N., Brinkhoff, T., Ferdelman, T. G., Mariné, M. H., Teske, A. & Jorgensen, B. (1999). Dense populations of a giant sulfur bacterium in Namibian shelf sediments. *Science* 284, 493–495.

- Singleton, P. & Dusart, J. (1999). Bacteriologie: cours : 2e cycle. Paris: Dunod.
- Stolz, J. F. (1993). Magnetosomes. Microbiology 139, 1663–1670.
- Tortora, G. J., Funke, B. R. & Case, C. L. (2012). Microbiology: An Introduction, 11ème édition. Benjamin Cummings.
- Cavaillon, J. M. (1996). Inflammation d'origine bactérienne. Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique, 36(8), 914-924.
- De Billerbeck, V. G. (2007). Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques. Phytothérapie, 5(5), 249-253.
- Berche, P. (2007). Une histoire des microbes. John Libbey Eurotext.
- ZAOUIA, Y. (2020). DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DES INFECTIONS BACTERIENNES.
- Sohikul I., 2008 : Mécanismes de résistance aux antibiotiques dans chromosomiques
- Bourabah A., 2015 : Les mammites d'origine bactériennes et mycosiques chez la chèvre locale à Tiaret, traitement alternatif par le miel et l'huile de Thymus fontanesil. Mémoire master, 67p.
- Denis F et al , Bactériologie médicale : Techniques usuelles.3ème édition 2016 Courvalin P , Leclercq R et al. AntibioGramme 3ème édition. ESKA. 2012 Frenay J , Renaud F et al . Précis de Bactériologie clinique. 2ème édition. 2007
- Archambaud M, Clavé D, Bactériologie et virologie pratique. 2ème édition 2011 E.Pilly. Maladies infectieuses et tropicales. 25ème édition 2016 CMIT
- ePOPI : Guide de traitement pour une bonne pratique médicale et bon usage des anti-infectieux . Web (www.epopi.fr)
- Gentilini M et al . Médecine tropicale , 6ème édition , Flammarion , Médecine Sciences Paris 2011.
- Mandell GL et al . Principles and practices of infectious diseases. 7ème ed. Philadelphia. e-Pilly TROP : http://www.infectiologie.com/site/_actualite_detail
- Clinical Microbiology and infection : official journal of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Disease
- Albert, Klaus, and Ernst Bayer. 1991. "Characterization of Bonded Phases by Solid-State NMR Spectroscopy." Journal of Chromatography A 544: 345–70.
- Ali, Jogothe et al. 2012. "Revisiting the General Solubility Equation: In Silico Prediction of Aqueous Solubility Incorporating the Effect of Topographical Polar Surface Area." Journal of chemical information and modeling 52(2): 420–28.

- Barret, Roland. 2018. *Principes Fondamentaux de Chimie Thérapeutique: Médicaments, Propriétés Physico-Chimiques, Prodrogues, Pharmacophore*. ISTE Group.
- Becke, A D. 1993. "Density-Functional Thermochemistry. III The Role of Exact Exchange J Chem Phys 98: 5648–5652."
- Begum, Robina et al. 2018. "Applications of UV/Vis Spectroscopy in Characterization and Catalytic Activity of Noble Metal Nanoparticles Fabricated in Responsive Polymer Microgels: A Review." *Critical reviews in analytical chemistry* 48(6): 503–16.
- Bitencourt-Ferreira, Gabriela, and Walter Filgueira de Azevedo. 2019. "Molegro Virtual Docker for Docking." *Docking screens for drug discovery*: 149–67.
- Blat, Yuval. 2010. "Non-competitive Inhibition by Active Site Binders." *Chemical Biology & Drug Design* 75(6): 535–40.
- Boskey, Adele L, and Richard Mendelsohn. 2005. "Infrared Spectroscopic Characterization of Mineralized Tissues." *Vibrational Spectroscopy* 38(1–2): 107–14.
- Brüschweiler, Rafael. 2003. "Efficient RMSD Measures for the Comparison of Two Molecular Ensembles." *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 50(1): 26–34.
- Cáceres, Elena L, Matthew Tudor, and Alan C Cheng. 2020. "Deep Learning Approaches in Predicting ADMET Properties." *Future Medicinal Chemistry* 12(22): 1995–99.
- Castagna, Rossella et al. 2019. "Biohybrid Electrospun Membrane for the Filtration of
- Chang, John C S, and Zhishi Guo. 1992. "Characterization of Organic Emissions from a Wood Finishing Product–Wood Stain." *Indoor Air* 2(3): 146–53.
- Cheng, Feixiong et al. 2012. "AdmetSAR: A Comprehensive Source and Free Tool for Assessment of Chemical ADMET Properties."
- Cheng, Tiejun et al. 2007. "Computation of Octanol– Water Partition Coefficients by Guiding an Additive Model with Knowledge." *Journal of chemical information and modeling* 47(6): 2140–48.
- 2017. "SwissADME: A Free Web Tool to Evaluate Pharmacokinetics, Drug-Likeness and Medicinal Chemistry Friendliness of Small Molecules." *Scientific reports* 7(1): 1–13.
- Damghani, Tahereh, Tahereh Sedghamiz, Shahrzad Sharifi, and Somayeh Pirhadi. 2020. "Critical C-Met-Inhibitor Interactions Resolved from Molecular Dynamics Simulations of Different c-Met Complexes." *Journal of Molecular Structure* 1203: 127456.
- Dascălu, Daniela et al. 2020. "Solubility and ADMET Profiles of Short Oligomers of Lactic

Acid.” ADMET and DMPK 8(4): 425–36.

- Decesari, Stefano, Maria Cristina Facchini, Sandro Fuzzi, and Emilio Tagliavini. 2000. “Characterization of Water-soluble Organic Compounds in Atmospheric Aerosol: A New Approach.” *Journal of Geophysical Research: Atmospheres* 105(D1): 1481–89.
- Delaney, John S. 2004. “ESOL: Estimating Aqueous Solubility Directly from Molecular Structure.” *Journal of chemical information and computer sciences* 44(3): 1000–1005.
- DeLano, Warren L. 2002. “Pymol: An Open-Source Molecular Graphics Tool.” *CCP4 Newsl. Protein Crystallogr* 40(1): 82–92.
- Dong, Jie et al. 2018. “ADMETlab: A Platform for Systematic ADMET Evaluation Based on a Comprehensively Collected ADMET Database.” *Journal of cheminformatics* 10: 1–11.
- Dong, Yun-wei, Ming-ling Liao, Xian-liang Meng, and George N Somero. 2018. “Structural Flexibility and Protein Adaptation to Temperature: Molecular Dynamics Analysis of Malate Dehydrogenases of Marine Molluscs.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115(6): 1274–79.
- Drwal, Malgorzata N et al. 2014. “ProTox: A Web Server for the in Silico Prediction of Rodent Oral Toxicity.” *Nucleic acids research* 42(W1): W53–58.
- Frisch, M J et al. 1988. “Gaussian, Inc., Wallingford, CT, 2004; C. Lee, W. Yang, RG Parr.” *Phys. Rev. B* 37: 785.
- Ghosal, Kajal, Dipanwita Ghosh, and Sanjoy Kumar Das. 2018. “Preparation and Evaluation of Naringin-Loaded Polycaprolactone Microspheres Based Oral Suspension Using Box- Behnken Design.” *Journal of Molecular Liquids* 256: 49–57.
- Ghose, Arup K, and Gordon M Crippen. 1986. “Atomic Physicochemical Parameters for Three- dimensional Structure-directed Quantitative Structure-activity Relationships I. Partition Coefficients as a Measure of Hydrophobicity.” *Journal of computational chemistry* 7(4): 565–77.
- Ghose, Arup K, Vellarkad N Viswanadhan, and John J Wendoloski. 1998. “Prediction of Hydrophobic (Lipophilic) Properties of Small Organic Molecules Using Fragmental Methods: An Analysis of ALOGP and CLOGP Methods.” *The Journal of Physical Chemistry A* 102(21): 3762–72.
- Giannuzzo, Amelia N, Héctor J Boggetti, Mónica A Nazareno, and Horacio T Mishima. 2003. “Supercritical Fluid Extraction of Naringin from the Peel of Citrus Paradisi.” *Phytochemical*

Analysis 14(4): 221–23.

- Hubbard, Roderick E, and Muhammad Kamran Haider. 2010. “Hydrogen Bonds in Proteins: Role and Strength.” eLS.
- Humphrey, William, Andrew Dalke, and Klaus Schulten. 1996. “VMD: Visual Molecular Dynamics.” *Journal of molecular graphics* 14(1): 33–38.
- Jablonský, M, J Kočíš, A Ház, and J Šima. 2015. “Characterization and Comparison by UV Spectroscopy of Precipitated Lignins and Commercial Lignosulfonates.” *Cell. Chem. Technol* 49(3–4): 267–74.
- and 3D Structural Information.” *Nucleic acids research*: gkw1000.
- Saab, Yolande B, Wissam Kabbara, Christiane Chbib, and Paul Richard Gard. 2007. “Buccal Cell DNA Extraction: Yield, Purity, and Cost: A Comparison of Two Methods.” *Genetic testing* 11(4): 413–16.
- Saab, Yolande B, Wissam Kabbara, Christiane Chbib, and Paul Richard Gard. 2007. “Buccal Cell DNA Extraction: Yield, Purity, and Cost: A Comparison of Two Methods.” *Genetic testing* 11(4): 413–16.
- Sauer, Anne, and Carmen I Moraru. 2009. “Inactivation of Escherichia Coli ATCC 25922 and Escherichia Coli O157: H7 in Apple Juice and Apple Cider, Using Pulsed Light Treatment.” *Journal of Food Protection* 72(5): 937–44.
- Sudto, Kanokorn, Surachai Pornpakakul, and Supason Wanichwecharungruang. 2009. “An Efficient Method for the Large Scale Isolation of Naringin from Pomelo (Citrus Grandis) Peel.” *International journal of food science & technology* 44(9): 1737–42.
- Vijesh, A M et al. 2013. “Molecular Docking Studies of Some New Imidazole Derivatives for Antimicrobial Properties.” *Arabian Journal of Chemistry* 6(2): 197–204.
- Wishart, David S. 2013. “Characterization of Biopharmaceuticals by NMR Spectroscopy.”
- *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 48: 96–111.
- Yang, Zi-Yi et al. 2021. “Benchmarking the Mechanisms of Frequent Hitters: Limitation of PAINS Alerts.” *Drug Discovery Today* 26(6): 1353–58.
- Yusof, Salmah, Hasanah Mohd Ghazali, and Gan Swee King. 1990. “Naringin Content in Local Citrus Fruits.” *Food Chemistry* 37(2): 113–21.

ANNEXES



ANNEXES

Annexs1 : *Produits chimiques* utilisé durant les étapes du traitement



Figure 1 : Mueller Hinton



Figure 2 : Eau physiologique stérile



Figure3 : Amoxicilline

Annexe2 : Liste du matériel utilisé durant les étapes du traitement

Instruments	Utilisation	Type d'appareillage
Bec bensène	Pour assurer une stérilisation instantanée.	
Bain marie	pour la Montage de chauffage	
Autoclave	stérilisation à la vapeur	

Balance de précision	Pèse les produits	
Incubateur	Incubation des cultures de micro-organismes	

Annexe3 : Photos représentant les résultats de l'activité antibactérienne d'extrait la naringine

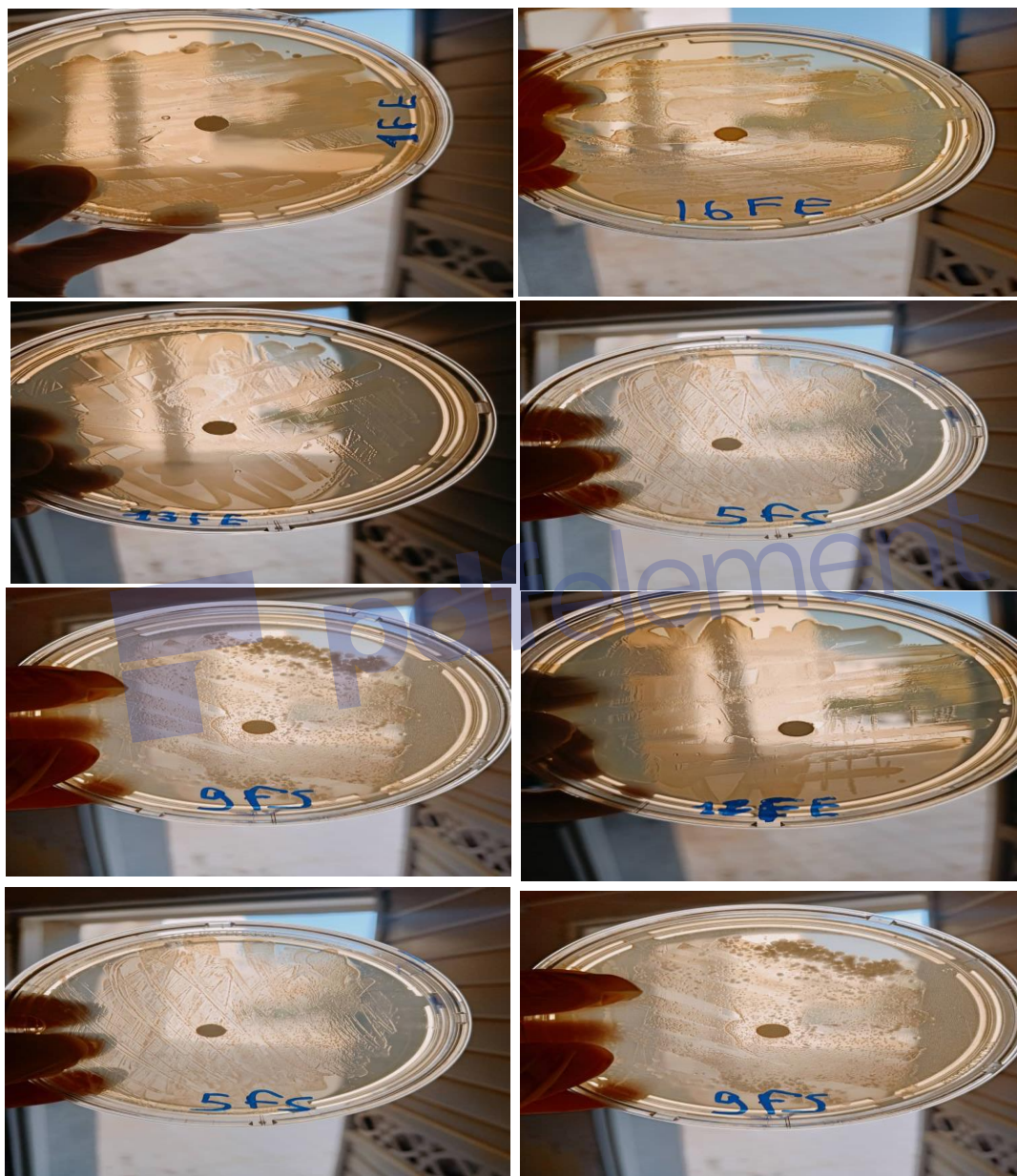


Figure3 : Zones d'inhibition de la naringine contre E. coli et S. aureus