

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Mouloud MAMMARI de TIZI-OUZOU
Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques
Département de Biochimie et de Microbiologie
MEMOIRE DE FIN D'ETUDES
En vue de l'obtention du Diplôme de Master académique en Biologie
Option: Biotechnologie Microbienne



**Évaluation de l'activité antibactérienne des composés
d'origine synthétique testés individuellement et en
combinaison.**

Travail proposé et dirigé par : Dr AMROUCHE T.

réalisé par : M^{lle} Sam Katia

Soutenu le : 17-07-2017, devant le jury:

Président : Mr ARKOUB M, Maitre Assistant chargé de cours à l'UMMTO.

Promoteur : Mr AMROUCHE T, Maitre de conférences " A ", à l'UMMTO.

Co- Promoteur : Mr ADKHIS M, Professeur, à l'UMMTO.

Examineur 1 : Mme REMANE-BEN MALLEM Y, Maitre assistante, chargée de cours, à l'UMMTO.

Examineur 2 : Mme BEN TAYEB S, Maitre assistante, chargée de cours, à l'UMMTO

Promotion 2016 - 2017

Remerciements

La première personne que nous tenons à remercier très chaleureusement est notre encadreur Mr AMROUCHE TAHAR, Maître de Conférences A, pour ses précieux conseils et son suivi permanent qui ont constitué un apport considérable à notre travail. Qu'il trouve par ces remerciements un hommage vivant à sa haute personnalité.

Nos sincères gratitudeux aux membres du jury d'avoir accepté d'examiner, d'évaluer ce travail et de l'enrichir par leurs propositions.

De précieux remerciements vont au Pr ADKHIS et son équipe notamment, de nous avoir reçu dans leur laboratoire et de nous avoir fourni les complexes chimiques testés dans cette étude.

Nous présentons nos sincères remerciements à Mr LAHLEB Mustapha, microbiologiste au sein du laboratoire Microbiologie du CHU Mustapha BACHA, de nous avoir fourni les souches de référence.

Nous remercions aussi Mr AKLI Amar, laborantin au laboratoire Microbiologie du CHU NEDDIR Mohammed de nous avoir procuré les souches bactériennes non référenciées.

Nous remercions également l'équipe du laboratoire de microbiologie du département d'Agronomie et du laboratoire commun de microbiologie du département biologie de l'UMMTO pour leur aide précieuse.

Et enfin, nous exprimons nos sincères remerciements à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.



Je dédie ce modeste travail

A la mémoire de mon frère Ali

A ma chère grand-mère Dehbia

A toute ma famille

A tous ceux qui me sont chers.

Katia



Liste des Figures et des Tableaux

Liste des Figures

Figure 1 : Mode d'action des antibiotiques.....	3
Figure 2 : Les différents mécanismes de la résistance d'une bactérie aux antibiotiques	4
Figure 3 : Structure de la nisine A	6
Figure 4 : Formation des pores membranaires par le complexe nisine-lipide II	6
Figure 5 : Schéma montrant un modèle de complexe chimique à base de cuivre	11
Figure 6 : Structure de l'adénine (a) et de la guanine (b)	15
Figure 7 : Structure de la cytosine (c), de la thymine (d) et de l'uracile(e)	15
Figure 8 : Structure chimique de la Diméthylglyoxime $dmgH_2$	16
Figure 9 : Résultats de la coloration de Gram observée au $G \times 1000$ à l'immersion	32
Figure 10 : Effet du DMSO et de l'eau physiologique stérile sur quelques bactéries étudiées	33
Figure 11 : Résultats du témoin négatif pour la méthode des puits.....	33
Figure 12 : Représentation graphique des résultats de l'antibiogramme sur les souches bactériennes	34
Figure 13 : Représentation graphique des résultats du criblage des chimiques.....	35
Figure 14 : Effet inhibiteur par la méthode des puits.....	37
Figure 15 : Relation dose (complexe chimique) et réponse (diamètre d'inhibition) sur quelques bactéries	38
Figure 16 : Représentation graphique des valeurs de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des complexes chimiques (%).....	39
Figure 17 : Photos illustrant l'effet de quelques combinaisons sur les souches bactériennes	42

Liste des Figures et des Tableaux

Liste des tableaux

Tableau I: Etat descriptif des différentes bactéries utilisées dans cette étude	26
Tableau II : Les complexes chimiques testés	26
Tableau III : Les ions métalliques testés	26
Tableau IV : Les types de ligands utilisés	27
Tableau V : Les complexes chimiques actifs (Etude biologique).....	38
Tableau VI: Détermination de l'effet bactéricide des différents agents antimicrobiens testés après repiquage sur le milieu MH	40
Tableau VII: Résultat de la sélection des combinaisons entre les complexes chimiques et l'effet de l'association.....	41
Tableau VIII: Résultats de combinaison du Complexe C4 versus C5 sur <i>E. coli</i>	43
Tableau IX: Résultats de combinaison du Complexe C4 versus C6 sur <i>E. coli</i>	44
Tableau X: Résultats de combinaison du Complexe C5 versus C6 sur <i>E. coli</i>	44
Tableau XI : Résultats de combinaison du Complexe C4 versus C6 sur <i>S. aureus</i>	44
Tableau XII: Résultats de combinaison du Complexe C4 versus C10 sur <i>S. aureus</i>	45
Tableau XIII : Résultats de combinaison du Complexe C6 versus C10 sur <i>S. aureus</i>	45
Tableau XIV : Résultats de combinaison du Complexe C4 versus C5 sur <i>P. aeruginosa</i> ..	45
Tableau XV : Résultats de combinaison du Complexe C4 versus C6 sur <i>P. aeruginosa</i>	46
Tableau XVI: Résultats de combinaison du Complexe C5 versus C6 sur <i>P. aeruginosa</i>	46
Tableau XII : Combinaison de l'HE de thym/le complexe chimique C6 sur <i>P. aeruginosa</i> .	47
Tableau XIII : Combinaison de l'HE de thym/ le complexe chimique C6 sur <i>E. coli</i>	47
Tableau XIX : Combinaison de l'HE de thym avec le complexe chimique C6 sur <i>S. aureus</i> ..	47

Liste des abréviations

Ade : adénine

ATCC: American Type Culture Collection

ATP: Adénosine triphosphate.

Br: Brome

CMB : Concentration Minimale Bactéricide.

CMI: Concentration Minimale Inhibitrice

DMSO : Di-Méthyl-Sulfoxyde.

DHP : dihydroptéroate

DHF : dihydrofolate

Glu : acide glutamique

Gua : guanine

H2dmg : diméthylglyoxime

HET : Huile essentielle de thym

Met : méthionine

MH : Mueller Hinton.

Ni : nickel

pH : Potentiel d'Hydrogène

Tyr : tyrosine

THF : tétrahydrofolate

UFC : Unité Formant Colonie

μl : Microlitre

WHO : World Health Organisation

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Résumé

Abstract

Agzul

Résumé en arabe

Sommaire

Première partie : Synthèse bibliographique

Introduction générale..... 1

Chapitre I : Agents antimicrobiens naturels

1. Les métabolites d'origine microbienne

1.1. Les antibiotiques 2

1.1.1. Généralités..... 2

1.1.2. Mécanisme d'action des antibiotiques..... 2

1.1.3. La résistance aux antibiotiques 3

1.1.3.1. Origines de la résistance 3

1.1.3.2. Diffusion de la résistance..... 3

1.1.3.3. Mécanismes de la résistance 3

1.2. Bactériocines 4

1.2.1. Généralités..... 4

1.2.2. Classes de bactériocines 5

1.2.3. Mécanisme d'action des bactériocines 6

1.2.4. Résistance bactérienne aux bactériocine 7

1.2.5. Application des bactériocines 7

1.3. Les huiles essentielles 7

1.3.1 Généralités..... 7

1.3.2. Mécanismes d'action des huiles essentielles sur les bactéries..... 8

1.3.3. Applications des huiles essentielles	9
---	---

Chapitre II : Agents antimicrobiens synthétiques

1. Agents antimicrobiens d'origine synthétiques	10
1.1. Généralités.....	10
1.2. Les complexes chimiques	10
1.2.1. Les métaux	12
1.2.1.1. Le cobalt	12
1.2.1.2. Le cuivre	12
1.2.1.3. Le nickel	13
1.2.2. Les Ligands	14
1.2.2.1. Les acides aminés	14
1.2.2.2. Bases azotées	14
1.2.2.3. La Diméthylglyoxime dmgH_2	15
1.3. Mécanisme d'action des complexes chimiques	16
1.4. Homéostasie des métaux lourds	17
1.4.1. Import des ions métalliques.....	17
1.4.2. Efflux des métaux	17
1.5. Les stratégies de défense des bactéries	17
1.5.1. Exclusion du métal par l'imperméabilité de la membrane.....	18
1.5.2. Séquestration intracellulaire.....	18
1.5.3. Séquestration extracellulaire	18
1.6. Applications des complexes chimiques	18
1.6.1. Les composés de coordination en catalyse	19
1.6.2. Les complexes en chimie des solutions.....	19
1.6.3. En médecine	19

Chapitre III : Interactions entre les agents antimicrobiens

1. Interactions entre les agents antimicrobiens.....	20
1.1. Action combinée des agents antimicrobiens	20
1.1.1. Complexes chimiques combinés avec d'autres agents antimicrobiens.....	21
1.1.1. Complexes chimiques combinés avec d'autres agents antimicrobiens.....	21
1.1.2. Bactériocines versus antibiotiques	21
1.1.3. Combinaison des bactériocines avec d'autres agents	22
1.1.4. Huiles essentielles versus antibiotiques	22

Deuxième partie : Etude expérimentale

Chapitre I : Matériel et méthodes

1. Matériel biologique	24
1.1. Méthodes	24
2. Vérification de la pureté des souches microbiennes	25
3. Evaluation qualitative et quantitative de l'activité antibactérienne	28
4. Détermination des CMI et CMB	29
5. Les combinaisons	30

Chapitre II : Résultats et discussions

1. Criblage des substances antimicrobiennes (screening)	32
2. Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices et Bactéricides	39
3. Effets de la combinaison des complexes étudiés.....	41

Conclusion et perspectives	48
----------------------------------	----

Références bibliographiques

Annexes

Introduction générale

De nos jours, le développement de la résistance des micro-organismes aux divers antibiotiques préoccupent les spécialistes en médecine et suscite un débat médiatique. L'autre préoccupation actuelle est l'utilisation des additifs tels que les antioxydants sont suspectés d'avoir des effets négatifs sur la santé du consommateur.

En effet, l'apparition et l'extension rapide du phénomène de résistance aux antibiotiques observé ces dernières décennies ont montré les limites de leur usage et mis fin à « l'âge d'or des antibiotiques ». Il devient donc urgent d'agir pour découvrir et développer de nouveaux médicaments afin de faire face à la menace des bactéries résistantes.

Selon l'organisation mondiale de la santé, les maladies infectieuses arrivent toujours au deuxième rang des principales causes de mortalité au monde (WHO, 2007). Devant cette situation, les efforts de recherches consacrés aux antimicrobiens se sont développés ces dernières années. Dans ce but, l'investigation des complexes chimiques commence à avoir beaucoup d'intérêts comme source potentielle de molécules à pouvoir antimicrobien et antioxydant, ceci pour leur éventuelle utilisation comme alternative pour le traitement des maladies infectieuses

La chimie des complexes a fait l'objet de plusieurs recherches. Parmi elles, celle concernant la complexation des ions métalliques par des ligands, à la fois en raison de leur architecture unique et de leurs applications thérapeutiques potentielles. Le grand intérêt accordé à ces composés est dû aussi à leur procédé facile de préparation, leur obtention avec de bons rendements, de leur grande stabilité thermique ainsi que leur grand pouvoir de coordination.

En outre, des complexes chimiques à base de métaux de transition (nickel, cuivre, cobalt...) avec de composés organiques (la diméthylglyoxime, acides aminés, bases nucléotidiques) non toxiques pour l'homme, font actuellement objet de nombreuses recherches scientifiques visant à démontrer leurs activités antimicrobiennes.

Le présent travail a pour objectif principal d'évaluer *in vitro* le pouvoir antimicrobien de vingt-trois complexes chimiques produits au laboratoire en choisissant quatre types de métaux de transition : le cobalt, le cuivre, le nickel et le fer, avec la diméthylglyoxime comme ligand principal. Ces complexes ont été obtenus par la complexation du métal sur différents ligands.

Ce mémoire est composé de deux parties. La première partie propose une mise au point bibliographique. Dans la seconde partie (pratique), nous avons décrit en détail le matériel, les techniques expérimentales et les modes opératoires entrepris. Les résultats obtenus sont ensuite discutés. Le manuscrit est achevé par une conclusion générale, les annexes et la liste des références bibliographiques.

I. Les métabolites d'origine microbienne

I.1. Les antibiotiques

I.1.1 Généralités

Les antibiotiques sont majoritairement représentés par des molécules d'origine naturelle et leurs dérivés. Ils peuvent aussi être d'origine synthétique ou semi-synthétique (Newman et *al.*, 2003 ; Singh et Barrett, 2006).

Les antibiotiques d'origine naturelle sont élaborés par des microorganismes agissant de façon très spécifique sur une cible moléculaire précise. Ils sont utilisés dans le traitement des infections bactériennes (Barrett, 2006).

Parmi les antibiotiques les plus connus, citons la streptomycine, employée pour traiter la tuberculose, et la pénicilline (produite par *Penicillium notatum*) (Hanock et *al.*, 1999). Ces métabolites ont la propriété d'interférer directement avec la prolifération des microorganismes à des concentrations tolérées par l'hôte (Avril et *al.*, 2002).

I.1.2 Mécanisme d'action des antibiotiques.

Les antibiotiques agissent par différents mécanismes sur les microorganismes pathogènes de façon à perturber leur métabolisme, voire les détruire. Pour cela, ils doivent avoir des sites de fixation comme la paroi bactérienne, le système nucléaire, la membrane cytoplasmique et les ribosomes.

Certains visent à inhiber la synthèse de la paroi bactérienne grâce aux enzymes associées à la membrane cytoplasmique comme les transpeptidases et les carboxypeptidases, possédant une structure qui permet de fixer les antibiotiques (Blumberg et Strominger, 1974 ; Weston, 2002). D'autres se fixent sur certains constituants des parois et altèrent leur perméabilité (Poole, 2002).

Les sulfamides, les quinolones et les rifamycines bloquent des molécules qui interviennent dans des réactions de synthèse des acides ribonucléiques (ARN) (Gill, 2008) et de la transcription de l'ADN en ARN messager. Par ailleurs, les aminosides exercent des interactions sur de multiples sites ribosomiaux ce qui perturbe le processus de synthèse protéique (Poole, 2002). Le mode d'action des antibiotiques est illustré dans la Figure 1.

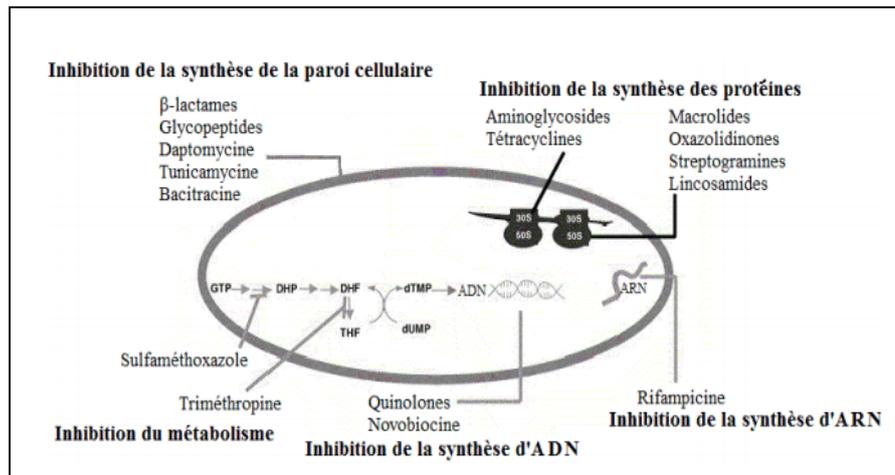


Figure 1 : Mode d'action des antibiotiques (Singh et Barrett, 2006)

I.1.3. La résistance aux antibiotiques

I.1.3.1. Origines de la résistance

La résistance aux antibiotiques peut être fréquemment codée par le microorganisme au niveau chromosomique ou plasmidique. La plupart des bactéries résistantes aux molécules antimicrobiennes contiennent des gènes de résistance situés sur les plasmides R, plutôt que sur des chromosomes (Perry et *al.*, 2004). Les souches bactériennes possédant ce plasmide, peuvent produire des enzymes qui modifient chimiquement ces antibiotiques par phosphorylation, acétylation ou adénylation. La molécule modifiée perd alors son activité antibiotique (Meyer et *al.*, 2004).

I.1.3.2. Diffusion de la résistance

La résistance héréditaire aux agents antibactériens est souvent portée par des plasmides ou par des petits fragments d'ADN appelés transposons : qui se déplacent d'une région de la molécule d'ADN à une autre. Certains plasmides y compris les facteurs R, peuvent être transférés entre les cellules bactériennes. Ces derniers possèdent souvent des gènes de résistance à plusieurs antibiotiques.

L'utilisation répandue des antibiotiques médicaux, vétérinaires et agricoles continue à fournir des conditions sélectives pour la diffusion des plasmides R avec des gènes de résistance aux antibiotiques, en sélectionnant et en favorisant les bactéries contenant ces plasmides (Tortora et *al.*, 2003).

I.1.3.3 Mécanismes de la résistance

Aucun antibiotique n'inhibe l'ensemble des microorganismes et quelques microorganismes sont naturellement résistants à certains antibiotiques (Meyer et *al.*, 2004).

Il y a plusieurs raisons pour lesquelles un microorganisme peut avoir une résistance naturelle à un antibiotique :

- Il peut ne pas posséder la structure ciblée par l'antibiotique. Par exemple, certaines bactéries ne possèdent pas de paroi bactérienne typique et sont donc résistantes aux pénicillines.
- Le microorganisme peut être imperméable à l'antibiotique. Ainsi, la plupart des bactéries à GRAM négatif sont imperméables à la pénicilline G.
- Il peut modifier la structure chimique de l'antibiotique en une forme inactive. Beaucoup de staphylocoques contiennent des β -lactamases qui peuvent couper le cycle β -lactame de la plupart des pénicillines.
- Il peut modifier la cible de l'antibiotique.
- Le microorganisme peut développer une voie biochimique résistante. Par exemple, de nombreuses bactéries pathogènes développent la résistance aux molécules de sulfamides qui empêche la production d'acide folique chez les bactéries. Ainsi les souches résistantes modifient leur métabolisme pour assimiler l'acide folique présent dans l'environnement
- Le microorganisme peut être capable de relarguer un antibiotique entré dans la cellule (mécanisme d'efflux), comme décrit dans la résistance de *Pseudomonas.aeruginosa* à de nombreux antibiotiques (Madigan et Martinko, 2007). Les différents mécanismes de la résistance d'une bactérie aux antibiotiques sont illustrés dans la Figure 2.

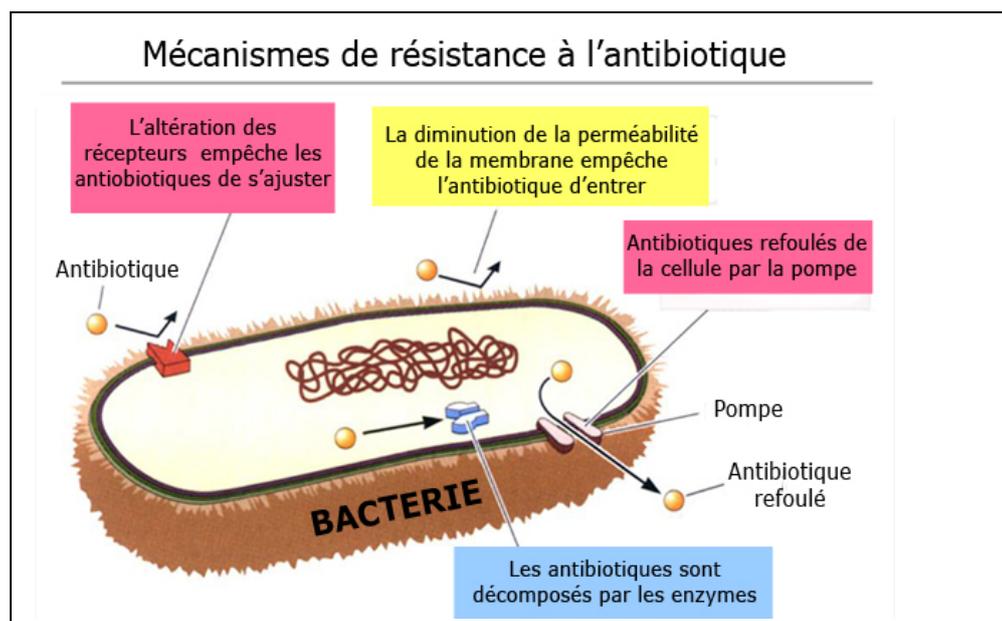


Figure 2 : Les différents mécanismes de la résistance d'une bactérie aux antibiotiques (Frere, 2008).

I.2. Bactériocines

I.2.1. Généralités

Le terme bactériocine fut employé pour la première fois par Jacob et *al*, (1953) pour les peptides à spécificité importante, produites par certaines souches et actives contre les souches de la même espèce. La première bactériocine nommée la colicine était produite par

E.coli (Gratia, 1925). La deuxième fut découverte en 1927. Nommée Nisine et produite par *Lactococcus lactis*, elle est utilisée de façon courante comme additif alimentaire (E234) pour la conservation de certains aliments (Gratia, 1925). La structure de la nisine A est illustrée dans la Figure 3.

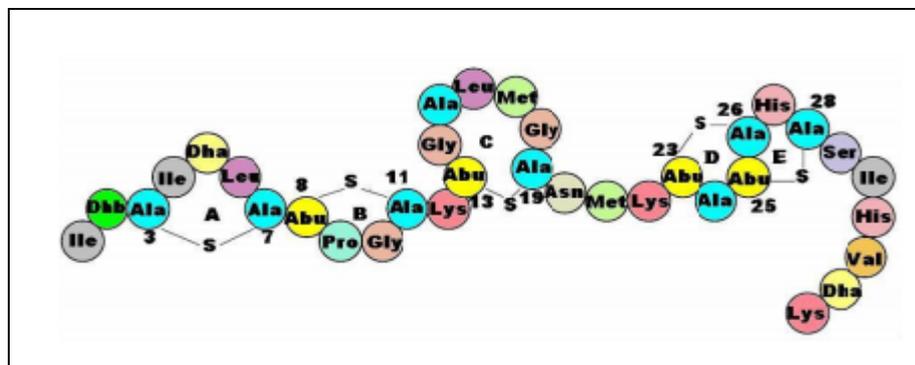


Figure 3 : Structure de la nisine A (Buchman *et al.*, 1988).

Les bactériocines sont définies comme des molécules sécrétées par les bactéries, de nature protéique ou partiellement protéique, le plus souvent cationiques, modifiées ou non post-traductionnellement, de masse moléculaire comprise entre 2 et 6 kDa (Heng *et al.*, 2007).

Ces substances bioactives présentent également une grande tolérance aux variations de pH et aux traitements thermiques. Tous ces critères suggèrent que les bactériocines peuvent être un substituant idéal des conservateurs chimiques (Dortu et Thonart, 2009).

Depuis leur découverte, près de 200 bactériocines, qui diffèrent de par leur structure et leur mécanisme d'action, ont été identifiées. La plupart d'entre elles ont comme caractéristique d'être très spécifiques envers les espèces bactériennes apparentées à celles qui les produisent. Ainsi, contrairement aux antibiotiques, elles peuvent cibler spécifiquement les bactéries pathogènes sans pour autant inhiber les bactéries indispensables.

Elles sont actives contre les bactéries à Gram positif. Néanmoins, certains auteurs ont observé que certaines bactériocines exercent aussi un effet inhibiteur contre les bactéries Gram négatives (Todorov *et al.*, 2005).

Ces substances protéiques biologiquement actives sont synthétisées au niveau du ribosome et codées par des gènes, leur sécrétion dans le milieu extracellulaire étant conférée par un système de transfert. Ces biomolécules se différencient par leur poids moléculaire, leurs propriétés biochimiques, leur origine génétique, ainsi que par leur spectre et mode d'action (Klaenhammer, 1988).

I.2.2 Classes de bactériocines : Les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont réparties en quatre classes, comme proposé par Klaenhammer, (1993).

- Classe I : Les lantibiotiques : peptides de taille inférieure à 5 kDa, stables à la chaleur et qui contiennent des acides aminés inhabituels soufrés formés post-traductionnellement (c'est-à-dire la lanthionine, la méthyl lanthionine, la déhydrobutyrine et la déhydroalanine).

- Classe II : Peptides de taille inférieure à 10 kDa, stables à la chaleur, ne contenant pas d'acides aminés modifiés. Leur point isoléctrique varie entre 8 et 10.
- Classe III : Protéines de taille supérieure à 30 kDa et sensibles à la chaleur.
- Classe IV : Peptides requérant une partie carbohydratee ou lipidique pour avoir une activité.

I.2.3 Mécanisme d'action des bactériocines

Bien que toutes les bactériocines partagent le même site d'action qui est la membrane cytoplasmique, leur mode d'action semble être différent (Dortu et Thonart, 2009).

Les lantibiotiques telle que la nisine, portant une structure cationique et amphiphile allongée, interagissent avec la membrane des cellules cibles soit en se liant au lipide II (un précurseur de peptidoglycanes) empêchant ainsi la synthèse de la paroi cellulaire conduisant à la mort de la cellule, soit en utilisant ce lipide comme une molécule d'appui pour s'insérer dans la membrane et y former des pores causant la destruction de la cellule suite à la dissipation du potentiel membranaire et l'efflux des petites molécules (ions, ATP, acides aminés, etc) (Figure 4).

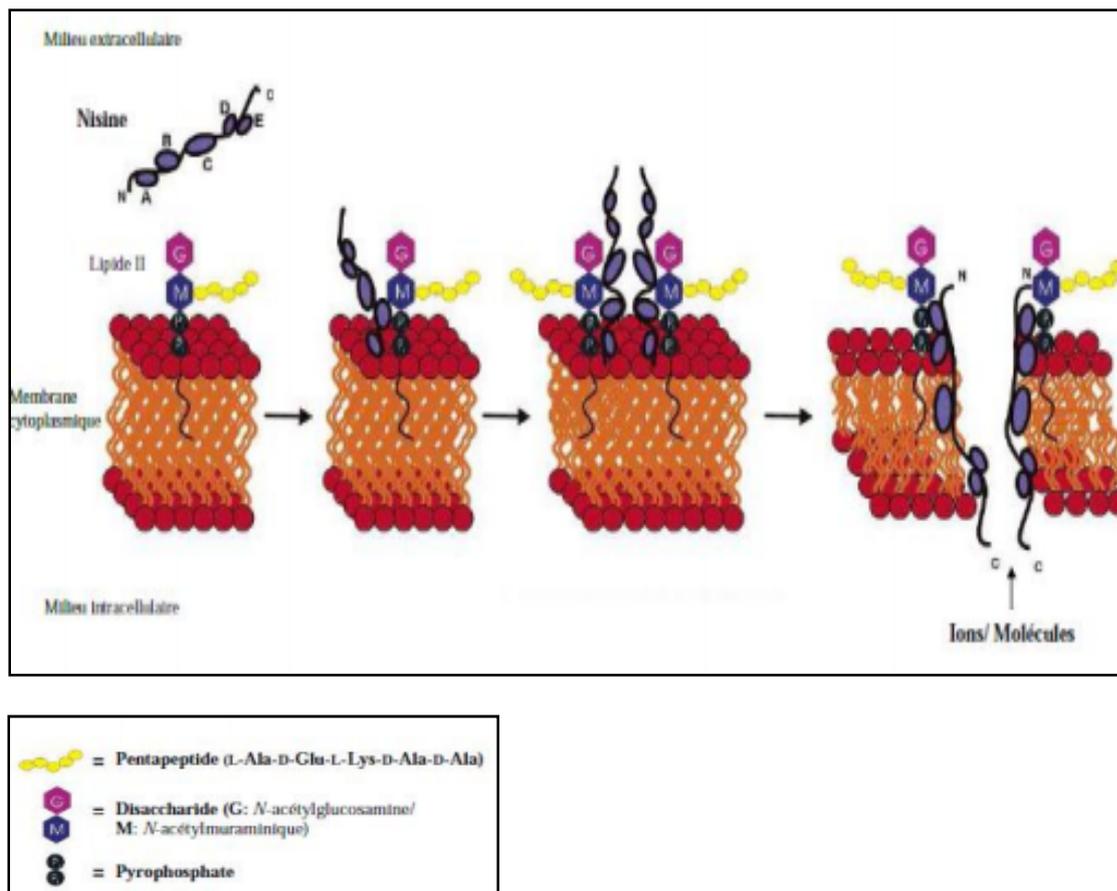


Figure 4 : Formation des pores membranaires par le complexe nisine-lipide II selon (Chatterjee et *al.*, 2005).

La mersacidine tue la cellule en interférant avec ses réactions enzymatiques comme la synthèse de la paroi (Dortu et Thonart, 2009). L'insertion des bactériocines de la classe II dans la membrane est conférée par la structure α -hélice amphiphile, cette insertion induit la perméabilisation de la membrane et par conséquent la mort cellulaire suite à l'écoulement des molécules à faible poids moléculaire (Mami et *al.*, 2008).

I.2.4 Résistance bactérienne aux bactériocines

Il existe pour les bactériocines deux types de résistants selon Duffes et *al.* (2000) :

Les résistants naturels : C'est- à-dire les souches qui sont insensibles à une bactériocine donnée sans adaptation particulière.

Les résistants induits: qui sont produits lorsqu'une souche naturellement sensible à une bactériocine présente un phénotype de résistance lié à une adaptation.

I.2.5. Application des bactériocines

Les bactériocines ont un immense potentiel dans les domaines agroalimentaire et pharmaceutique.

Les bactériocines sont, pour la plupart, inodores, sans goût, mais surtout, non toxiques ce qui a mené à leur approbation par la FDA (Food and Drug Administration). De ce fait, plusieurs compagnies de production se sont tournées vers les bactériocines, comme bio-conservateurs pour assurer la qualité de leurs produits (Hassan et *al.*, 2012).

Outre leur application antibactérienne, ces peptides microbiens ont été montrés utiles comme spermicides, hypotenseurs artériels, comme agents antiviraux, anti-tumoraux et anti-inflammatoires (Dick et *al.*, 2011). De récentes découvertes élargissent significativement le spectre du potentiel d'utilisation de ces molécules dans la médecine moderne.

Certaines bactériocines possèdent une activité antimicrobienne plus vaste qui peut même s'étendre jusqu'aux protozoaires, levures, champignons, et les virus (Reddy et *al.*, 2004).

I.3.Les huiles essentielles

I.3.1 Généralités

Les huiles essentielles (HEs) sont des complexes naturels de molécules volatiles et odorantes, synthétisées par les cellules sécrétrices des plantes aromatiques. Celles-ci les conservent dans des poches au niveau de certains organes (Peyron et Neves, 1977).

Selon l'AFNOR (2010), une HE désigne un produit obtenu à partir d'une matière première d'origine végétale, après séparation de la phase aqueuse par des procédés physiques : soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des plantes contenant des citrals, ou bien par distillation sèche. Cette dernière contient en moyenne soixante-quinze molécules actives. Ces molécules actives impliquées dans les mécanismes de défense des plantes, sont issues du métabolisme secondaire, elles ne

participent pas directement à la croissance des plantes, mais ont évolué pour leur fournir une protection naturelle contre les attaques de microbes ou d'insectes. (Guinoiseau, 2010).

L'activité biologique d'une huile essentielle est liée à sa composition chimique, aux groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, composés terpéniques et cétoniques) et à leurs effets synergiques (Zhiri, 2006).

I.3.2. Mécanismes d'action des huiles essentielles sur les bactéries

Selon Cristiani *et al.*, (2007), le mode d'action des HEs diffère selon la structure de la membrane des microorganismes, généralement les bactéries Gram positive sont plus sensibles que les Gram négatives qui présentent des lipopolysaccharides sur leur membrane extérieure la rendant hydrophile, empêchant les terpènes hydrophobes d'y adhérer.

Rayour (2003) a examiné le mécanisme d'action des HEs, des clous de girofle et d'origan (*Origanum vulgare*) simultanément avec ceux de deux de leurs composants, le thymol et l'eugénol, sur des bactéries: *E. coli* et *Bacillus subtilis* et qui ont été utilisées respectivement comme modèles de bactérie Gram+ et Gram-. Les deux HEs tout comme leurs deux composants ont été capables d'induire une lyse cellulaire. Cette action a été démontrée par la libération de substances absorbantes à 260 nm. Cette libération de substances associée à la mortalité bactérienne pourrait être la conséquence de lésions sur les enveloppes induites par les agents antibactériens. L'utilisation d'un microscope électronique a permis de montrer que les HEs attaquaient en même temps les membranes et les parois cellulaires.

Les travaux de Burt, (2004) ont montré qu'une HE active exercera son pouvoir antimicrobien par son interférence avec la bicouche lipidique de la cellule cible grâce à sa propriété hydrophobe, ce qui entraîne une perturbation de la perméabilité et perte des constituants de la cellule. En plus, cette réaction varie en fonction de la nature de la bicouche lipidique, ce qui explique la résistance des bactéries Gram- (Mahmoud *et al.*, 2004). En outre, Mahmoud et ses collaborateurs (2004), Guesmi et Boudabous (2006) ont avancé l'hypothèse d'inactivation et destruction du matériel génétique. En fin, Caillet et ses collaborateurs (2007) ont signalé que les H.Es empêchent la multiplication des bactéries, leur sporulation et la synthèse de leurs toxines.

Lorsque l'on parle d'activité antimicrobienne, on distingue deux sortes d'effets: une activité létale ou bactéricide et une inhibition de la croissance ou activité bactériostatique. Le plus souvent l'action des huiles essentielles est assimilée à un effet bactériostatique (Zhiri, 2006). Cependant, certains de leurs constituants chimiques semblent avoir des propriétés bactéricides. En effet, plusieurs études ont montré l'apparition de fuites d'ions potassium dans les cellules microbiennes (*Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*) en contact avec de l'huile essentielle. Cette fuite de potassium est la toute première preuve de l'existence de lésions irréversibles au niveau de la membrane de la bactérie. Le thymol, le carvacrol, des composants actifs d'huiles essentielles, rendent perméable la membrane des bactéries, un effet précurseur de leur mort. Les huiles essentielles ont donc bien des propriétés bactéricides (Zhiri, 2006).

D'après Caillet et ses collaborateurs (2007), l'action antimicrobienne des H.Es se déroule en trois phases:

- Attaque de la paroi bactérienne par l'H.E, provoquant une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaire;
- Acidification de l'intérieur de la cellule, bloquant la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure;
- Destruction du matériel génétique, conduisant à la mort de la bactérie.

I.3.3. Applications des huiles essentielles

Selon Grysole, (2005), les HEs commercialisées dans le monde sont destinées à quatre grands secteurs industriels : cosmétique, alimentation et médecine (Grysole, 2005).

L'industrie alimentaire utilise les HEs pour rehausser le goût, aromatiser et colorer les aliments (Aprotosoia et *al.*, 2010).

Le secteur des boissons gazeuses s'avère un gros utilisateur d'huiles essentielles (Grysole, 2005).

Les huiles essentielles possèdent des profils de composition chimique différents. Leur utilisation comme agents de conservation est due à la présence de composés ayant des propriétés antimicrobiennes et antioxydantes (Hammer et *al.*, 2011).

Les huiles essentielles de citrus limon servent à la fabrication d'arômes alimentaires, d'essences fruitées, de boissons rafraichissantes, de liqueurs, de pâtisseries et de confiseries (Choi et *al.*, 2000).

Les huiles essentielles peuvent être ajoutées à peu près à tous les aliments. Ainsi, les huiles essentielles d'origan, de thym, de cannelle ou de coriandre sont efficaces pour les viandes, les volailles, les charcuteries et les légumes ; l'huile essentielle de menthe pour les produits frais (salades, yaourts...) (Turgeon, 2001).

I. Agents antimicrobiens d'origine synthétique

I.1. Généralités

Les agents antimicrobiens sont essentiels pour le traitement d'un certain nombre de maladies d'origine bactérienne ou fongique. Cependant, les bactéries ont acquis une résistance aux médicaments et ainsi le développement de nouveaux agents antimicrobiens est nécessaire.

Les complexes de métaux de transition ont été largement étudiés dans le passé. Durant les quatre dernières décennies, les chimistes ont commencé à se rendre compte que beaucoup de molécules biochimiques sont des composés de coordination impliquant un ou plusieurs ions métalliques coordonnés à des groupements organiques, parfois volumineux et complexes.

La chimie des complexes a fait l'objet de plusieurs recherches. Parmi elles, celle concernant la complexation des ions métalliques par des ligands. Ces derniers, peuvent se présenter sous forme de différents types ayant des sites coordinats de nature variée.

Il est bien connu que les complexes de Ni, Co et Cu avec la diméthylglyoxime comme ligand principal créent un environnement flexible autour du métal. En effet, la nature des interactions aux niveaux des liaisons a été révélée dans de nombreuses études précédentes (Bing-yin Jiang et *al.*, 2004).

Les complexes de Ni, Co et Cu avec l'acide aspartique et l'acide glutamique sont rapportés et caractérisés (El-Ghanami et *al.*, 2004). Il est rapporté dans la littérature Robinda et *al.*, (2005) que les ions métalliques se coordonnent avec les acides aminés par les atomes donneurs N, O, S qu'ils contiennent dans leur chaîne latérale.

En outre, la complexation des ions métalliques Ni, Co et Cu avec les bases puriques et pyrimidiques comme ligands a fait l'objet de beaucoup d'investigation. Les sites de coordination sont aussi élucidés. Un cation métallique est capable de se lier avec beaucoup de sites différents d'acides nucléiques. En général, les sites favorisés sont le groupe phosphate chargé négativement et les atomes riches en électrons N et O (Hodgson, 1977 ; Serano et al, 2002).

De nos jours, les complexes de métaux de transition connaissent un développement spectaculaire. Ce développement est observé dans un grand nombre de domaines : biologie, médecine, catalyse, l'industrie pharmaceutique, métallurgie et l'environnement...

I.2. Les complexes chimiques (composés de coordination)

Un complexe (Figure 5) est constitué d'un ion métallique central sur lequel viennent se fixer un certain nombre de molécules neutres ou d'ions, appelés ligands. Les propriétés chimiques de l'assemblage qui en résulte dépendent de la nature de la liaison entre l'ion métallique et les ligands d'une part et de l'arrangement géométrique de ceux-ci autour de l'ion central d'une autre part (Mehmet et Selahattin, 2006).

L'interaction entre un ligand donneur d'électrons et un cation métallique peut être assimilée à une association entre une base et un acide (Walton, 1998).

La classification des complexes se base sur le nombre d'ions (ou d'atomes) centraux qu'ils comportent. Les complexes dont les formules sont organisées autour d'un seul ion central sont des complexes monométalliques (mononucléaires). Si l'entité complexe comporte deux ou plusieurs ions métalliques on la désigne par les termes : bimétallique (binucléaire), trimétallique (trinucléaire), polymétallique (polynucléaire) (Fay *et al*, 2005).

-Elément central = Métal, le plus souvent cation métallique (accepteur d'électron).

-Ligand (coordinat) = donneur d'électrons atome ou groupement d'atomes ou molécules.

-Le nombre de liaisons formées par l'atome central est le nombre de coordination.

L'ensemble des complexes ont une formule générale comme suit.



M : atome central (métal).

L : ligands pairs (apporte une ou plusieurs pairs d'électrons au métal)

X : ligands radicalaires (apporte un ou plusieurs impair d'électrons au métal)

z : charge du complexe (si elle n'est pas nulle)

l : nombre de ligands de type L coordonnés

x : nombre de ligands de type X coordonnés

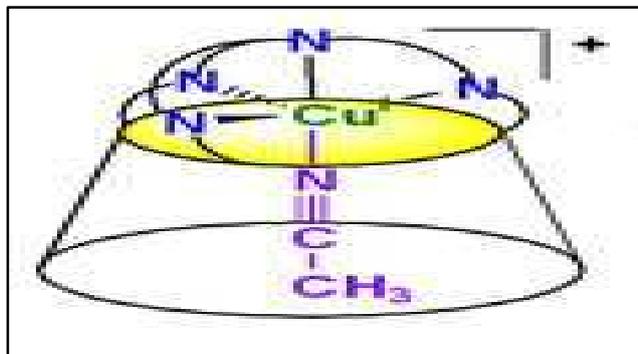


Figure 5: Schéma montrant un modèle de complexe chimique à base de cuivre (Walton, 1998).

I.2.1. Les métaux

Les métaux de transition sont des éléments présentant une configuration électronique incomplète de la sous-couche de valence «d». C'est précisément cette orbitale qui, parce qu'elle n'est pas totalement remplie, permet aux métaux de transition de former des complexes avec des ligands non métalliques (Gerloch, 2000).

Tous les éléments de transition ont quelques propriétés communes :

- Ce sont des métaux, relativement durs, possédant en général une forte densité et une température de fusion élevée.

-Les atomes des métaux sont liés entre eux par des liaisons métalliques.

-Ils conduisent la chaleur, l'électricité et ils peuvent former des alliages.

- L'existence de plusieurs états d'oxydation est une caractéristique des éléments de transition, avec le changement d'état d'oxydation, il y a un changement de la configuration électronique (Atkins et Jones, 1997).

Les ions métalliques comme le cuivre et le nickel sont parmi les éléments essentiels présents dans beaucoup d'espèces, en l'occurrence les protéines. Cependant, un excès de ces ions dans l'organisme humain peut nuire gravement à la santé (Atkins et Jones, 1997).

Le cuivre, le nickel et le cobalt sont capables de réagir avec des ligands mono-, bi- et polydentés pour former des composés complexes avec diverses applications (environnementale, biologique et médical) (Rigo *et al*, 2004).

I.2.1.1.Le cobalt

Le cobalt est un élément présent naturellement dans l'environnement : l'eau, la terre et les roches. Il présente certains bienfaits pour l'homme. Cependant, à des concentrations trop importantes il peut être nocif.

Lorsque le cobalt est engagé dans un complexe, il acquiert une stabilité remarquable. La majorité de ses complexes sont diamagnétiques. Il peut aussi être utilisé comme un agent de séchage ou un catalyseur dans la polymérisation de glycérides insaturés. Il présente une affinité pour les atomes d'azotes et les atomes d'oxygène donateurs d'électrons. Il montre aussi une aptitude remarquable à donner des complexes mixtes octaédriques.

Le cobalt est biologiquement essentiel, il est identifié comme un constituant de nombreuses enzymes. Par ailleurs, le cobalt constitue l'atome central de la vitamine B12 (Eddie *et al*, 2010).

I.2.1.2.Le cuivre

Le cuivre est un oligo-élément, présent dans l'organisme à faible concentration et sans lequel la vie ne serait pas possible. Le cuivre est nécessaire au bon fonctionnement de certains

enzymes. Il est essentiel pour la stimulation du système immunitaire contre les infections et le maintien de l'homéostasie.

Cependant, pour les bactéries, le cuivre n'est pas un élément essentiel. Il joue un rôle bénéfique pour les organismes supérieurs (animaux) et non pour les organismes inférieurs (virus et bactéries). Donc sa présence à l'intérieur de ces derniers est considérée comme étrangère (Ren et al, 2009).

Le cuivre métallique est assez résistant à la corrosion et n'est pas attaqué par l'air sec, l'eau, ou les acides non-oxydants. Toutefois, les propriétés d'oxydoréduction du cuivre peuvent également provoquer des dommages au sein de la cellule (Nelson, 1999).

Lorsque la concentration en cuivre intracellulaire dépasse la concentration autorisée par les systèmes de régulation, le cuivre peut se lier de manière non spécifique et non appropriée à différentes protéines (Nelson, 1999).

Les mécanismes par lesquels le cuivre massif éradique les virus et bactéries font toujours l'objet d'études. Cependant, les recherches effectuées sont suffisantes pour confirmer l'efficacité à large spectre de ce métal et de ses alliages (Boudesocque, 2008).

Il est important de noter que même dans des conditions de contact sec dans un environnement intérieur, le cuivre possède la capacité d'inactiver en permanence les agents pathogènes. En interagissant avec la structure cellulaire, le cuivre déclenche une série de phénomènes en cascade, notamment l'interruption rapide des fonctions vitales et la compromission de l'intégrité de la membrane cellulaire. Ceci permet au cuivre de pénétrer dans la structure de l'organisme et de totalement perturber son métabolisme. L'étape finale est la détérioration du matériel génomique. Face à ces réactions en bloc, il y a extrêmement peu de chance que la bactérie puisse développer une résistance aux alliages de cuivre (Shriver et Atkins, 2001).

I.2.1.3. Le nickel

Le nickel est l'un des composants principaux du noyau terrestre. Il est brillant Argenté-blanc. Les applications les plus importantes du métal de nickel comportent son utilisation dans de nombreux alliages. De tels alliages sont employés pour construire les divers équipements, navires de réaction, les missiles, et les composants aérospatiaux. Le métal a aussi quelques utilisations importantes, des anodes de nickel sont utilisées pour le nickelage de beaucoup de métaux non précieux pour augmenter leur résistance à la corrosion (Rigo et al, 2008).

Le nickel est capable de réagir avec des ligands mono-, bi- et polydentés pour former des composés complexes avec diverses applications (environnementale, biologique et médical).

Dans la chimie de nickel, ce dernier est en état d'oxydation le plus important soit dans une solution aqueuse ou non-aqueuse. Il forme des sels avec presque tous les anions

en solution aqueuse et en absence d'un ligand complexant fort, il existe sous forme d'un ion vert (Dakhel et al., 2006).

L'activité antifongique des complexes de nickel a été démontrée par des études préliminaires avec les complexes cristallographiques caractérisés des ligands glycoside contenant de triamine, qui empêchent la croissance de la levure pathogène (*Candida albicans*) (Pradyot, 2003).

I.2.2. Les Ligands

Les molécules ou les atomes qui entourent l'atome central (le métal) sont les ligands (coordinats), connectés au centre métallique par une liaison chimique. Les ligands sont des groupes anioniques ou neutres qui sont considérés comme donneurs d'électrons. Toutefois, certains ligands possédant aussi des orbitales (π) saturées et des orbitales (π) vacantes susceptibles d'accepter un transfert électronique du métal vers le coordinat. Ils peuvent porter des appellations un peu différentes lorsqu'ils font partie de composés de coordination

Les ligands peuvent être :

- des ions constitués d'un seul atome (les ions halogénures : Cl⁻, Br⁻, I⁻).
- des ions moléculaires neutres (l'eau H₂O ou l'ammoniac NH₃).
- des molécules organiques (l'acétate CH₃COO⁻) ou minéraux: (le phosphate PO₄³⁻).

Les ligands jouent un rôle très important dans la chimie organométallique, depuis qu'ils peuvent provoquer des changements dans les propriétés chimiques et physiques des complexes des métaux de transitions (Kettle, 1992).

I.2.2.1. Les acides aminés

Ce terme définit une famille de composés présentant une fonction amine et une fonction acide carboxylique. Ils sont utilisés comme agents chélateurs analytiques. Les acides aminés, qui représentent l'unité des protéines, saisissent donc l'attention parce qu'ils peuvent se lier à des cations métalliques comme, d'autres ligands organiques riches en sites de coordination (un ou deux groupes carboxyles, groupe aminé), en plus, leur mode de coordination est flexible (ligands monodentate, bidentate ou tridentate) (EL Gahami et al., 2004).

I.2.2.2. Bases azotées

Les bases azotées sont des molécules cycliques qui contiennent de l'azote N et qui entrent dans la composition des acides nucléiques l'ADN et l'ARN, elles sont composées de bases puriques et de bases pyrimidiques.

- **Les bases puriques**

Ce sont des constituants de l'ADN et de l'ARN. Elles sont principalement l'adénine et la guanine (Figure 6), ce sont des dérivés de la purine. Leurs molécules sont des bases azotées formées de deux cycles adjacents (Weinman et Mehul, 2000).

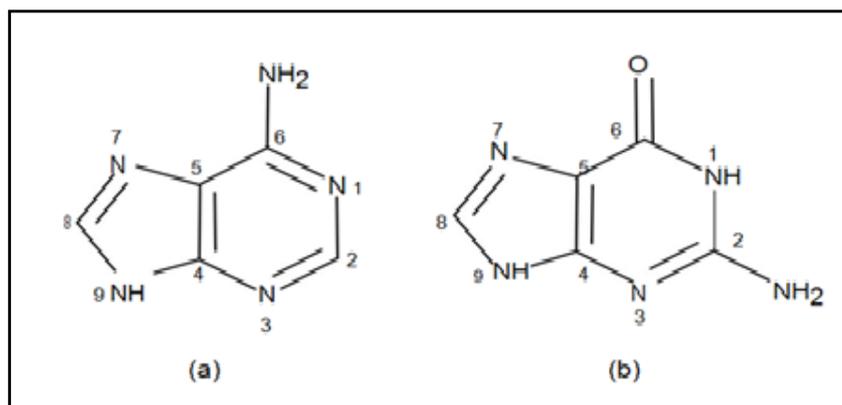


Figure 6 : Structure de l'adénine (a) et de la guanine (b)
(Weinman et Mehul, 2000).

- **Les bases pyrimidiques :**

Elles sont contenues dans l'ADN. Il y a trois bases pyrimidiques : la thymine, l'uracile et la cytosine (Figure 7), elles dérivent de la pyrimidine. Ce sont des molécules contenant de l'azote et qui entrent, comme les bases puriques, dans la composition des nucléotides et des nucléosides (Weinman et Mehul, 2000).

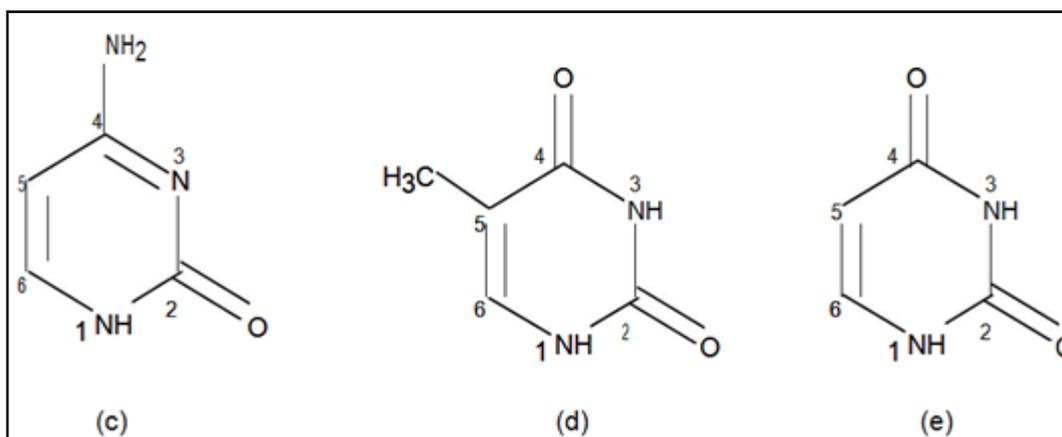


Figure 7 : Structure de la cytosine (c), de la thymine (d) et de l'uracile(e)
(Weinman et Mehul, 2000).

I.2.2.3. La Diméthylglyoxime dmgH_2

Le Diméthylglyoxime est un ligand chélatant avec une bonne capacité à former des complexes mono-bi-ou trinocléaires (Coropceanu et *al.*, 2009).

Le Diméthylglyoxime (Figure 8) avec les deux azotes de la fonction oxime ($>\text{C}=\text{N}-\text{OH}$) peut chélater les cations métalliques (Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{3+}) pour former des complexes octaédriques dont la structure est stabilisée par des liaisons hydrogènes (Birsén et *al.*, 2006).

Son abréviation est dmgH_2 pour la forme neutre, et dmgH pour la forme anionique.

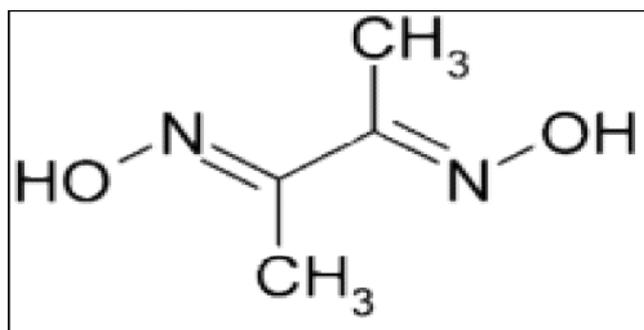


Figure 8: Structure chimique de la Diméthylglyoxime dmgH_2 (Birsen *et al.*, 2006).

I.3. Mécanisme d'action des complexes chimiques

Selon l'étude de Jamieson et Lippard (1999) portée sur le mécanisme d'action des complexes métalliques, il a été montré que le complexe reste dans son état neutre, il entre ensuite dans la cellule vivante par diffusion passive à travers la membrane. La diminution de la concentration en ions chlorure facilite son hydrolyse en complexes très réactifs.

Les complexes très électrophiles obtenus par l'hydrolyse peuvent réagir avec divers nucléophiles cellulaires, comme l'ARN, l'ADN, acides aminés, le glutathion ou la méthionine. Les cibles principales sont les atomes d'azote des bases purines et pyrimidines de l'ADN, c'est à dire les atomes N7 et N1 de l'adénine, N3 de la cystéine et N7 de la guanine. Selon Scott et Bradbury (1994), il a été démontré que l'ADN est la cible la plus préférée pour la plupart des activités biologiques anti-cancer et des thérapies antivirales.

En particulier, le cuivre et ses ligands ont été largement étudiés en raison de leurs fortes interactions avec l'ADN via des associations de surface ou intercalations puis de clivage de l'ADN à travers des mécanismes d'hydrolyse ou d'oxydation (Santoyo *et al.*, 2005).

Selon l'étude de Santoyo *et al* (2005), un large éventail d'activités biologiques a été attribué au complexe de cuivre, en l'occurrence les activités antibactériennes, antifongiques, antioxydantes et anticancéreuses.

L'activité antifongique des complexes de nickel a été démontrée par des études préliminaires avec les complexes cristallographique caractérisés des ligands glycoside-contenant de triamine, qui empêchent la croissance du *candida albicans* (Pradyot, 2003).

Ils peuvent également jouer un rôle très important au sein de la cellule. Par exemple, le fer, le cuivre ; éléments centraux du site catalytique de nombreuses enzymes, intervenant dans le transport de l'oxygène.

1-4 Homéostasie des métaux lourds

Les ions métalliques sont la cause d'un stress pour la cellule si la concentration d'un ion en particulier est insuffisante, si elle est excessive, ou si un ion toxique est présent dans le cytoplasme. L'homéostasie des métaux regroupe les mécanismes qui permettent aux cellules, d'équilibrer les processus d'import et d'export tout en se protégeant de leurs effets toxiques (Hobman et *al.*, 2007)

I.4.1. Import des ions métalliques

Les procaryotes utilisent deux types de systèmes servant à l'entrée des métaux lourds à l'intérieur des cellules.

- Le premier est un système passif et constitutif de la cellule, il est de faible affinité et rapide. Il est emprunté par une grande variété de substrats. Il est constitué principalement par des protéines de la famille MIT (Metal Inorganic Transport). Il est emprunté par la plupart des cations pour entrer à l'intérieur des cellules (Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} ...). Il utilise généralement l'énergie du gradient osmotique à travers la membrane plasmique des bactéries. Ce système n'étant pas spécifique d'un ion particulier, n'importe quel ion peut entrer dans la cellule, en particulier dans le cas où il est présent en très grande concentration : c'est pourquoi les ions métalliques deviennent toxiques (Nies, 1999).
- Le second système de transport est un système actif, de haute affinité pour le substrat. Il est plus lent, et utilise souvent l'hydrolyse de l'ATP comme source d'énergie (Nies, 1999 ; Gatti et *al.*, 2000).

I.4.2. Efflux des métaux

Afin d'agir sur l'homéostasie des métaux, toutes les cellules ont besoin d'une machinerie de transport pour exporter les métaux essentiels en trop forte concentration et les métaux toxiques (Ma et *al.*, 2009). Plusieurs systèmes d'export ont été prédits ou démontrés comme étant impliqués dans le transport du nickel et/ou du cobalt hors du cytoplasme (Nies, 2003) ou même du périplasma, mais ce ne sont pas des transporteurs spécifiques de ces métaux dans la plupart des cas. (Li et *al.*, 1997 ; Li et *al.*, 2007).

1.5. Les stratégies de défense des bactéries

Sachant que les ions métalliques ne peuvent pas être dégradés ou modifiés comme les composés organiques toxiques, les systèmes de résistance aux métaux lourds ne peuvent utiliser que trois mécanismes possibles : la complexation, la réduction et l'efflux (Nies, 1999). La réduction est un procédé utilisé par divers micro-organismes pour éliminer les métaux. Il en résulte lors de la réduction du métal un état d'oxydation moins toxique. En effet, la plupart des produits de réduction sont soit insolubles, soit encore plus toxiques que les espèces non réduites. Ainsi, la réduction est nécessairement couplée à la séquestration de l'ion réduit, qui l'empêche de nuire, ou à l'efflux qui élimine le composé réduit (Nies, 1999).

1.5.1. Exclusion du métal par l'imperméabilité de la membrane

Les bactéries limitent l'entrée des métaux en modifiant la production des porines (Lutkenhaus, 1977). Ainsi, il a été montré par des études protéomiques portant sur *E. coli*, qu'un stress par les ions cadmium provoquait, chez cette bactérie, une diminution de la synthèse de la porine OmpF (Faber et al., 1993). Cette protéine étant supposée jouer un rôle dans l'entrée des métaux, la baisse de sa production aura, de ce fait, un impact sur l'accumulation intracellulaire des ions métalliques.

1.5.2. Séquestration intracellulaire

Ce mécanisme de défense repose sur la production de protéines qui chélatent les excès d'ions métalliques pour d'une part, stocker ces ions et pour d'autre part, protéger les composants essentiels des cellules de leur toxicité potentielle. L'exemple le mieux caractérisé est la production de métallothionéines (MT) en réponse à un excès de zinc dans la cellule. De nombreuses MT ont été caractérisées chez les eucaryotes, mais ces protéines sont rares chez les bactéries et, on les observe principalement dans des souches de cyanobactéries et de pseudomonas où elles lient et séquestrent le zinc intracellulaire (Robinson et al., 2001).

1.5.3. Séquestration extracellulaire

La résistance aux ions métalliques par séquestration extracellulaire est surtout répandue chez les levures et les champignons. Toutefois, quelques exemples sont également recensés chez les bactéries. Ainsi, les couches exopolysaccharidiques de *K. aerogenes*, *P. putida* ou encore *Arthrobacter viscosus* sont capables de chélater certains métaux comme le cadmium, les empêchant de pénétrer dans le cytoplasme et augmentant ainsi significativement la résistance des bactéries à ces ions (Scott et Palmer, 1988).

I.5.Applications des complexes chimiques

Ces dernières décennies, beaucoup de travaux ont été menés sur la chimie de coordination des composés ayant une activité biologique. Dans ces nombreuses études, des complexes de Cu, Ni et Co avec différents ligands ont été synthétisés et caractérisés (El-Ghanami et al, 2004).

En effet, les complexes métalliques avec des acides aminés comme ligands ont reçu beaucoup d'attention parce qu'ils sont connus pour être des agents antibactériens. Ils sont aussi utilisés comme médicaments (Stanila et al., 2009).

Les composés de coordination ont une importance capitale et interviennent dans divers domaines :

I.5.1. Les composés de coordination en catalyse

La configuration des ligands autour d'un centre métallique, la possibilité d'échanger des ligands, rend les complexes métalliques extrêmement utiles en catalyse.

En effet, la coordination à un centre métallique abaisse l'énergie d'activation de réaction par formation d'un ou plusieurs complexes intermédiaires et influe sur la sélectivité

de la réaction. Dans la nature, il y a aussi des complexes métalliques qui interviennent dans les métalloprotéines (fer dans l'hémoglobine, magnésium dans la chlorophylle, cuivre dans l'hémocyanine...) (Dakhel et *al.*, 2006).

1.5.2. Les complexes en chimie des solutions

Les complexes en chimie des solutions ont des utilités multiples :

- solubiliser un métal contenu dans un minéral (exemple : l'or solubilisé comme un complexe cyanuré) ;
- caractériser la présence d'une espèce chimique par formation d'un complexe coloré.

1.5.3. En médecine

- Parmi les métaux les plus utilisés en médecine, on trouve le cuivre et ses complexes qui occupent une place de choix. On distingue principalement trois types d'utilisation thérapeutique du cuivre (principalement sous sa forme Cu^{2+}) : dans le traitement des inflammations, des agressions infectieuses ou encore de certains cancers.
- Des complexes de platine sont utilisés dans le traitement de certains cancers (cisplatine, carboplatine, oxaliplatine...).
- La capacité complexante de l'EDTA est mise à profit dans le traitement d'intoxication par des métaux, le plomb en particulier (Losada, 2001).

Par ailleurs, les complexes du cuivre suscitent un intérêt particulier puisqu'ils constituent des alternatives prometteuses comme agents anti tumoral, antiviral, et anti-inflammatoires (Noyce et *al.*, 2006).

Les complexes du Fe, Zn et Ni qui sont préparés à partir d'un dérivé d'amine et salicylaldehyde sont utilisés comme un antioxydant, et aussi comme agent antimicrobien vis-à-vis des bactéries à Gram positif et à Gram négatifs (Pradyot, 2003).

I. Interactions entre les agents antimicrobiens

I.1. Action combinée des agents antimicrobiens

De nos jours, les combinaisons des agents antimicrobiens ont connu un développement spectaculaire du fait qu'elles offrent de nombreux avantages comme la réduction du coût et des concentrations. Ces combinaisons peuvent diminuer donc l'altération de la qualité organoleptique et leurs effets indésirables.

Cox *et al* (2001) ont pu déterminer l'efficacité de la combinaison des agents bactéricides et bactériostatiques qui contiennent des composés agissant sur la même cible et présentant des interactions chimiques, cela peut causer une destruction de la paroi interne et externe du pathogène. De même Evandro *et al* (2009) ont proposé de combiner l'huile essentielle de thym et l'acide lactique sur les staphylocoques afin d'améliorer la qualité microbiologique de certains aliments ce qui pourrait apparaître comme une alternative intéressante pour l'industrie alimentaire.

D'après Bag *et al* (2015), il est important d'évaluer l'efficacité antibactérienne et antioxydante des interactions des huiles essentielles de graines de cumen et de coriandre par rapport à des bactéries d'origine alimentaire importantes (*Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Salmonella typhimurium*). Les résultats démontrent que ces combinaisons peuvent être utilisées comme une source potentielle antimicrobienne naturelle et comme agents antioxydants dans les industries pharmaceutiques et alimentaires.

Ko *et al* (2015) sont parvenus à réduire les contaminations des *E. coli* sur une surface de viande de bœuf en combinant l'HE de thym et l'acide lactique.

Afin de réduire la dose efficace des agents antimicrobiens, des huiles essentielles de cannelle, clou de girofle, de menthe et de thym ont été testées en combinaison contre des isolats fongiques du genre *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* *Fusarium solani*, l'effet de ces mélanges est considéré comme un synergisme. La plus forte activité a été montrée par l'huile essentielle de thym combinée avec l'huile essentielle de la cannelle avec des valeurs inférieures à 1 µl (Horvath *et al.*, 2016).

Pour cribler une variété d'effets combinés, Moon *et al* (2016) ont examiné les effets antimicrobiens de sauce de soja mélangée avec : le thymol, l'eugénol, le trans-cinnamaldéhyde, de l'acide β-résorcylique, et la vanilline contre *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella Typhimurium*, et *Listeria monocytogenes*. La sauce combinée avec carvacrol et thymol a induit la plus grande activité antibactérienne contre toutes les bactéries testées, alors qu'aucune de ces substances n'a

montré une activité bactéricide lorsqu'elles sont utilisées seules. Ces résultats suggèrent que le carvacrol et le thymol agissent en synergie avec d'autres facteurs présents dans la sauce de soja ce qui augmente l'activité antimicrobienne contre les principaux agents pathogènes d'origine alimentaire. La synergie est attribuée à la combinaison de deux facteurs (concentration principalement élevée en sel et un pH faible conféré par des acides organiques) présents dans la sauce.

I.1.1. Complexes chimiques combinés avec d'autres agents antimicrobiens

Toutefois, l'efficacité de la combinaison des HEs et des acides organiques pourrait apparaître comme une alternative intéressante pour l'industrie alimentaire du fait que les concentrations inhibitrices sont réduites, ce qui évitera l'altération de la qualité organoleptique des aliments.

Un mélange contenant l'huile essentielle de thym et un complexe chimique est doté d'une activité antimicrobienne et un pouvoir inhibiteur même à faible concentration ce qui traduit l'amélioration de l'activité du complexe chimique en présence du thymol. Cela est expliqué par la formation de nouvelles molécules lors de la combinaison auxquelles les germes ne sont pas adaptés (Musiol et al., 2014).

Une étude récente a montré l'efficacité des complexes métalliques contre *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *klebsiella pneumoniae* et *Proteus mirabilis* combinés avec d'autres agents de nature organique. Les zones d'inhibition de ces combinaisons étaient très larges, les bactéries se sont montrées sensibles, donc l'effet est significatif par rapport à l'antibiotique standard (Streptomycine) (Muneera et al., 2016).

Des bactériocines ont été combinées avec de différents complexes chimiques à base d'acide aminés contenant des groupes méthyle, éthyle, tert-butyle et benzyle liés à la partie ester par liaison amine. La présence de ces structures a influencé les propriétés physico-chimiques des bactéries. La masse volumique du mélange a été considérée comme un facteur important en plus de la solubilité pour obtenir une activité antibactérienne relativement élevée contre *Staphylococcus aureus* (Czerwonka et al., 2016).

I.1.2. Bactériocines versus antibiotiques

La résistance bactérienne aux antibiotiques est sans aucun doute l'un des plus gros défis qu'on doit surmonter. Les infections causées par les pathogènes augmentent et l'effet des antibiotiques n'a pas duré, voire leur sur-utilisation qui a engendré l'émergence des souches résistantes. Ainsi une bactérie résistante à un antibiotique d'une famille rend généralement tous les antibiotiques de cette famille inefficaces (Lussier-Price, 2008).

Les bactériocines possèdent un mécanisme d'action différent par rapport aux antibiotiques. Ces derniers peuvent inhiber la synthèse de la membrane cellulaire et des éléments essentiels pour la survie des bactéries, tandis que les bactériocines forment des trous dans la membrane bactérienne. Ainsi, théoriquement, les bactéries résistantes aux antibiotiques ne devraient pas être résistantes aux bactériocines puisqu'elles ne font pas appel au même mécanisme. En effet, en 2008, une étude *in vivo* portée chez les souris a montré que la Mersacidine (bactériocine produit par l'espèce *Bacillus*) était capable d'inhiber la croissance d'une des souches bactériennes résistantes aux antibiotiques (Sass et *al.*, 2008).

I.1.3. Combinaison des bactériocines avec d'autres agents

La combinaison des bactériocines avec d'autres traitements de conservation chimique ou physique donne des résultats prometteurs pour la conservation des aliments. Les molécules chimiques peuvent être des acides organiques, le nitrite, le chlorure de sodium, l'éthanol, des huiles essentielles ou des agents chélatants tel que l'EDTA, le phosphate trisodique, le citrate.

Ces agents chélatants permettent de séquestrer les ions magnésium des lipopolysaccharides de la membrane externe des bactéries Gram- permettant aux bactériocines d'atteindre la membrane interne, siège de leur activité. D'autre part, l'utilisation d'inhibiteurs de protéases ou de protéines de soja a été suggérée afin de prévenir la dégradation des bactériocines par les protéases présentes dans le produit à conserver (Kouakou et *al.*, 2008).

I.1.4. Huiles essentielles versus antibiotiques

Les huiles essentielles se retrouvent généralement chez les végétaux supérieurs plus exactement chez les genres capables d'élaborer les constituants qui les composent. Ces mélanges très complexes sont constitués de multiples molécules leur conférant des propriétés variées. Chimiquement, les antibiotiques sont constitués d'une unique molécule, à présent produites en masse par l'industrie pharmaceutique. Dans la mesure où elle est constituée d'une seule molécule, la bactérie synthétise une substance rendant l'antibiotique inactif, le processus se développe à tel point que certaines bactéries deviennent capables de se nourrir de cette substance sensée les détruire. Cela ne se produit jamais avec les traitements aromatiques et même si des résistances se manifestent, le plus souvent elles diminuent avec l'amélioration du terrain et n'apparaissent pas chez d'autres patients. (Franchomme, 2001).

Aucun antibiotique n'inhibe l'ensemble des microorganismes et quelques microorganismes sont naturellement résistants à certains antibiotiques (Meyer *et al.*, 2004). Il suffit alors qu'une des bactéries développe par mutation une enzyme permettant d'inactiver cette

molécule, ou d'en inverser l'action, pour mettre en péril toute l'action thérapeutique (Poole, 2002). Aucun antibiotique n'inhibe l'ensemble des microorganismes et quelques microorganismes sont naturellement résistants à certains antibiotiques (Meyer et *al.*, 2004).

En outre, certaines molécules antibiotiques présentent une toxicité sévère. Plus grave encore, les effets secondaires occultes entraînant l'inhibition progressive des systèmes de défense du corps et le déséquilibre de la flore intestinale ouvrent la porte aux candidoses et aux viroses et aux pathologies qui y sont directement et indirectement liées.

Les huiles essentielles utilisées selon des normes précises, donnent lieu à des "effets secondaires bénéfiques" à l'ensemble de l'organisme et la flore symbiotique, habituée depuis des milliers d'années à vivre avec les molécules aromatiques. Enfin, le système immunitaire voit son activité modulée dans le sens le plus favorable à la défense et à l'épanouissement de l'organisme (Franchomme, 2001).

Sienkiewicz et al (2017) ont démontré que les huiles essentielles peuvent renforcer l'effet des antibiotiques contre les bactéries pathogènes dans les plaies. La susceptibilité des bactéries aux antibiotiques, aux huiles essentielles et à leur combinaison a été évaluée à l'aide de la méthode de diffusion du disque. Bien que les huiles essentielles de la cannelle, du clou de girofle, du thym et de la lavande aient la plus grande activité antibactérienne lorsqu'elles ont été utilisées seules, les principaux effets additifs et synergiques contre les bactéries pathogènes en association avec les antibiotiques recommandés ont été démontrés par l'huile essentielle du basilic, de sauge classique et les huiles de romarin.

Ce travail expérimental a été réalisé au sein du laboratoire de microbiologie de la faculté des sciences biologiques et des sciences agronomiques – Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou.

L'objectif de cette étude est :

- Evaluation du pouvoir inhibiteur de la croissance bactérienne de vingt trois complexes chimiques, produits au laboratoire de la chimie de coordination de la faculté des sciences - Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou.
- Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI), ainsi que les concentrations minimales bactéricides (CMB).
- Etude des interactions entre les agents antimicrobiens actifs par combinaison deux à deux.

Matériel

I. Matériel biologique

I.1. Souches microbiennes testées

Le choix des souches bactériennes testées dans cette étude a été basé sur les caractères suivants :

- pathogénicité
- altération des aliments
- résistance aux antibiotiques
- Pour cela, nous avons sélectionné deux bactéries à Gram+, quatre bactéries à Gram- qui sont indiquées dans le Tableau I

Tableau I: Etat descriptif des différentes bactéries utilisées dans cette étude.

Souches bactériennes	Morphologie et type de Gram	Habitat et origine	Pouvoir pathogène	Provenance
<i>Eschérichia. coli</i> ATCC 25923	Cocobacilles à Gram négatif	Commensale du tube digestif de l'homme et des animaux	Diarrhées, gastro-entérites Infections urinaires	Laboratoire de microbiologie du centre hospitalier universitaire (CHU) Mustapha Bacha d'Alger
<i>Pseudomonas. aeruginosa</i> ATCC 27853	Bacilles à Gram négatif	Germe ubiquitaire, vivant en milieu humide et fréquent en milieu hospitalier	Infections pulmonaires, Infections urinaires, Méningites, septicémies	Laboratoire de microbiologie du centre hospitalier universitaire (CHU) de Tizi-Ouzou Nedir Mohamed

<i>Klebsiella. pneumoniae</i>	Bacilles à Gram négatif	Commensale du tube digestif et de l'appareil respiratoire de l'homme et des animaux	Infections respiratoires, Infections urinaires, septicémies	Laboratoire de microbiologie du centre hospitalier universitaire (CHU) de Tizi-Ouzou Nedir Mohamed
<i>Proteus. mirabilis</i>	Bacilles à Gram négatif	Commensale de l'intestin de l'homme et des animaux	Infections localisées surtout cutanée Infections des voies respiratoires Septicémies	Laboratoire de microbiologie du centre hospitalier universitaire (CHU) de Tizi-Ouzou Nedir Mohamed
<i>Staphylocoque. aureus</i> ATCC 43300	Cocci en grappes de raisin à Gram positif	Ubiquitaire dont le réservoir est localisé au sein de la peau et des muqueuses	Intoxication alimentaire Infections cutanées et des muqueuses, Septicémies, pneumonies	Laboratoire de microbiologie du centre hospitalier universitaire (CHU) Mustapha Bacha d'Alger
<i>Bacillus. Cereus</i>	Bacilles à Gram positif	Germe ubiquitaire dans le sol, dans l'eau de mer, dans l'eau douce et sur les plantes.	Intoxications alimentaires, Infections des plaies, méningites, infections du système nerveux central, infections respiratoires .	laboratoire de microbiologie de la société pharmaceutique (Aldaph-Novonordisk) sise à la zone industrielle Oued-Aissi de Tizi - Ouzou.

I.2. Les agents anti microbiens : complexes chimiques

Les complexes chimiques testés ont été élaborés et caractérisés par l'équipe du Professeur ADKHIS, laboratoire de chimie de coordination, Département de chimie – Université Mouloud MAMMARI de Tizi Ouzou. Les complexes ont été conservés sous forme cristalline à l'abri de la lumière après avoir été mis en solution dans le Di-Méthyl-Sulfoxyde (DMSO).

Afin d'obtenir des concentrations suffisantes pour provoquer une activité antimicrobienne, les complexes ont été préparés à une concentration de 10mg/ml.

Les différents complexes chimiques sont rapportés dans le Tableau II.

Tableau II : Les complexes chimiques testés

Désignation	Structure chimique
Cpx1	H ₂ dmg
Cpx2	Fe Gua Br H ₂ dmg
Cpx3	Fe Gua I H ₂ dmg
Cpx4	[Co(Hdmg) ₂ (Ura)Cl]
Cpx5	[Co(Hdmg) ₂ (Ura)Br]
Cpx6	[Co(Hdmg) ₂ (Ura)I]
Cpx7	[Cu(Hdmg)(Met)]NO ₃
Cpx8	[Cu(Hdmg)(Met)]Br
Cpx9	Uracil
Cpx10	[Cu(Hdmg)(Met) ₂](SCN) ₂
Cpx11	Methionine
Cpx12	[Cu(Hdmg)(Morph) ₂
Cpx13	[Ni(Hdmg)(Morph) ₂
Cpx14	Morpholine
Cpx15	Fe Aden Br H ₂ dmg
Cpx16	Aden Cl H ₂ dmg
Cpx17	Fe Aden H ₂ dmg I
Cpx18	Fe Arg I H ₂ dmg
Cpx19	Fe Arg CL H ₂ dmg
Cpx20	Fe Tyr H ₂ dmg
Cpx21	Fe Arg Br H ₂ dmg
Cpx22	Fe Tyr Cl H ₂ dmg
Cpx23	Fe Tyr I H ₂ dmg

Les ions métalliques et les types de ligands testés individuellement sont indiqués dans le Tableau III et le Tableau IV.

Tableau III : Les ions métalliques testés

Les éléments centraux (ions métalliques)
Co=Cobalt
Cu= Cuivre
Fe=Fer
Ni=Nickel

Tableau IV : Les types de ligands utilisés

Ligands		
Eléments chimiques	Bases azotées	Acides aminés
Hdmg=diméthylglyoxime	Ura=Uracil	Met=Methionine
Mor=Morpholine	Gua=Guanine	Tyr=Tyrosine
Br= Brome	Ade=Adenine	Arg= Arginine
Cl=Chlore		
I=Iode		
SCN= thiocyanates		

Méthodes

II. Vérification de la pureté des souches microbiennes

II.1. Préparation du milieu de culture

Le milieu de culture approprié à cette étude est le milieu Muller-Hinton préparé comme suit :

- Dissoudre 38 g de la gélose Muller-Hinton (Annexe I) dans un litre d'eau distillée.
- Faire bouillir avec agitation jusqu'à dissolution complète
- Autoclaver pendant 15 minutes à 121°C
- Finalement couler le milieu dans les boîtes de Pétri dans la zone aseptique du bec bunsen.

II.2. Purification des souches bactériennes

Les souches bactériennes testées sont des souches pures conservées dans le milieu TSA à 4°C. Chacune des six souches a été repiquée plusieurs fois sur le milieu MH et incubée à 37°C afin d'obtenir des cellules jeunes de 15 à 18 heures.

Une coloration différentielle de Gram a été réalisée suivie d'une observation microscopique dans le but de confirmer la pureté des souches, par la forme, la taille, le mode d'agencement des cellules ainsi que le type de Gram.

La coloration de Gram (voir annexe2).

II.3. Préparation de l'inoculum

II.3.1. Préparation de la pré-culture

Les tests antibactériens sont réalisés à partir de cultures jeunes en phase exponentielle de croissance (culture de 15 à 18 heures). Les souches bactériennes sont repiquées sur le milieu MH gélosé, puis les boîtes sont incubées à 37°C pendant 16 heures.

II.3.2. Préparation de la suspension bactérienne

Dans la zone aseptique du bec bunsen et à partir de cultures pures de 16 heures, prélever à l'aide d'une pipette Pasteur quelques colonies bien isolées de chacune des souches à tester. Décharger la pipette dans 10 ml d'eau physiologique stérile à 0,9%, puis homogénéiser. Les suspensions bactériennes sont ensuite standardisées à 10^6 UFC/ml en effectuant des dénombrements sur la cellule de Malassez et des dilutions décimales, si nécessaire.

III. Evaluation qualitative et quantitative de l'activité antibactérienne.

III.1. Test in vitro

L'évaluation de l'activité antimicrobienne a été réalisée par la méthode des puits décrite par Ismail et al. (2008). Cette méthode consiste à estimer l'inhibition de la croissance des germes testés au contact des différents échantillons d'agents antimicrobiens étudiés.

III.2 Protocole expérimental

III.2.1 Méthode des puits

La méthode des puits consiste à estimer l'inhibition de la croissance des germes testés au contact des différents échantillons d'agents antimicrobiens étudiés.

Le milieu de culture gélosé Mueller-Hinton en surfusion (45°C environ) est coulé dans des boîtes de Pétri en raison de 20ml par boîte.

Après solidification des boîtes, nous avons prélevé 100 μl de la suspension bactérienne standardisée à 10^6 UFC/ml. Cette dernière a été étalée à l'aide d'un râteau sur la surface du milieu gélosé. Et on laisse sécher.

Des puits d'environ 6mm de diamètre ont été confectionnés à l'aide d'une pipette Pasteur retournée et flambée à son extrémité large. À l'intérieur de ces puits, nous avons déposé 50 μl de chaque échantillon à tester. Les boîtes sont, ensuite, fermées et laissées diffuser pendant 30 minutes.

De même, des antibiogrammes avec des antibiotiques de référence : Amoxicilline Amoxicilline-acide clavulanique, Ciprofloxacine, Sulfaméthoxazole+Triméthopri et Chloromphenicol ont été réalisés afin de servir de témoins positifs pour comparer les résultats. Aussi, des puits ne contenant que du DMSO, de l'eau distillée stérile ainsi qu'avec les différents échantillons ont été réalisés afin de servir de témoins négatifs.

La lecture est réalisée après 24 heures d'incubation à 37°C . Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés à l'aide d'une règle et exprimés en millimètre (mm) (le diamètre du puits (6mm) est inclus).

Selon Ponce et *al*, (2003), la sensibilité des différentes souches vis-à-vis des agents antimicrobiens étudiés est classée selon le diamètre d'inhibition suivant ces critères :

Non sensible ou résistante, si : $\emptyset < 8$ mm ;

Sensible si : $9 \text{ mm} < \emptyset < 14$ mm ;

Très sensible si : $15 \text{ mm} < \emptyset < 19$ mm ;

Extrêmement sensible si : $\emptyset \geq 20$ mm.

IV. Détermination des CMI et CMB

IV.1. Détermination des CMI (concentrations minimales inhibitrices)

La méthode par dilution a pour but d'évaluer des concentrations minimales inhibitrices. Elle consiste à déterminer la plus faible concentration d'un agent antimicrobien, nécessaire pour inhiber la croissance d'un microorganisme.

IV.1.1. Préparation des dilutions

Les dilutions des complexes chimiques ont été réalisées dans le DMSO.

Des dilutions successives ont permis de préparer une gamme de dilution.

Nous avons réalisé trois dilutions ; 1/2, 1/4, 1/8

50% : pour 1/2 : 25 μ l du complexe chimique +25 μ l du DMSO.

25% : pour 1/4 : 12,5 μ l du complexe chimique +37,5 μ l du DMSO.

12,5% : pour 1/8 : 6,25 μ l du complexe chimique +43,75 μ l du DMSO.

Mélanger les volumes variables de l'agent antimicrobien à tester. Puis, prendre 50 μ l de la dilution obtenue et la verser dans chaque puits des boîtes de Pétri préalablement coulées et ensemencées par chaque souche.

Les boîtes sont, ensuite, incubées à 37°C pendant 24h les bactéries

La CMI sera donc la plus petite concentration pour laquelle il n'y'a aucun développement visible de chaque souche.

IV.2. Détermination des CMB (concentrations minimales bactéricides)

La CMB a été définie comme la plus faible concentration antibiotique détruisant 99,9% de l'inoculum

Après détermination de la CMI, la détermination des CMB sera réalisée par un prélèvement à l'anse autour chacun des puits ne présentant aucune culture visible. Chaque prélèvement est déposé en stries sur gélose Mueller-Hinton. La boîte ensemencée est incubée 24 heures à 37°C.

V. Les combinaisons

Le dernier objectif de cette étude est d'évaluer l'efficacité des complexes chimiques en combinaison.

Lors de ce test, nous avons procédé:

- _ A la détermination de l'effet résultant de l'association de deux complexes chimiques.
- _ A la réalisation des combinaisons entre les complexes chimiques présentant une synergie lors de leur association, afin de déterminer les concentrations infimes pour lesquelles cette combinaison reste active sur la souche considérée.
Cette étape nous permet aussi de déduire le complexe ayant un pouvoir inhibiteur élevé lors de la combinaison.
- _ A l'évaluation de l'efficacité des complexes chimiques en combinaison avec l'huile essentielle de thym.

Notons que les mélanges obtenus sont testés par la méthode des puits sur les trois souches de référence *E.coli*, *P.aeruginosa*, *S.aureus*.

V.1. Sélection des combinaisons actives sur les souches bactériennes (screening).

Ce test consiste à combiner deux complexes chimiques, dotés d'une activité antimicrobienne, de même volume, pour un volume final de 50 μ l. Ensuite, nous avons testé l'activité du mélange par la méthode des puits sur les souches bactériennes.

La lecture des résultats s'effectue après incubation des souches et consiste en la mesure des diamètres des zones d'inhibition. L'interaction est considérée comme positive lorsque le diamètre d'inhibition dépasse 8 mm.

V.2. Détermination de l'effet de l'association à partir de la sélection des combinaisons actives

Nous avons mélangé à partir des CMI obtenues, pour chaque complexe, des volumes décroissants de ces derniers, Ensuite, le volume final a été testé par la méthode des puits sur les souches bactériennes.

D'après PIBIRI (2005), les effets des combinaisons d'agents antimicrobiens sont définis selon quatre interactions possibles :

Indifférence : l'activité d'un agent antimicrobien n'est pas affectée par l'autre.

(A+B)= Effet A ou Effet B

Addition : l'effet de l'association est égal à la somme des effets de chaque agent étudié isolément, à la même concentration que dans l'association.

(A+B)= Effet A +Effet B

Synergie : l'effet est significativement supérieur à la somme de chaque agent étudiée isolément, à la même concentration.

$$(A+B) > \text{Effet A} + \text{Effet B}$$

Antagonisme: l'association diminue l'activité de l'un des agents antimicrobiens ou de l'autre. Elle est inférieure à la somme des effets de chacun pris séparément.

$$(A+B) < \text{Effet A} + \text{Effet B}$$

I. Criblage des substances antimicrobiennes (screening)

I.1. Activité antibactérienne

L'étude in vitro du pouvoir antimicrobien des complexes chimiques en utilisant le milieu MH pour les bactéries nous a conduit à l'obtention des résultats illustrés dans des tableaux et figures.

L'activité antibactérienne est estimée en terme de diamètre des zones d'inhibition autour des puits testés. Les souches sont classées en : sensibles, extrêmement sensibles ou résistantes.

I.1.1. Résultat de la coloration de Gram

La coloration de Gram a été réalisée dans le but de contrôler la pureté de chaque souche bactérienne utilisée.

Les souches utilisées ont été confirmées par une observation microscopique après une coloration de Gram réalisée sur des cellules issues de cultures jeunes.

Les résultats de la coloration de Gram sont illustrés par les photos présentées dans la Figure 9.

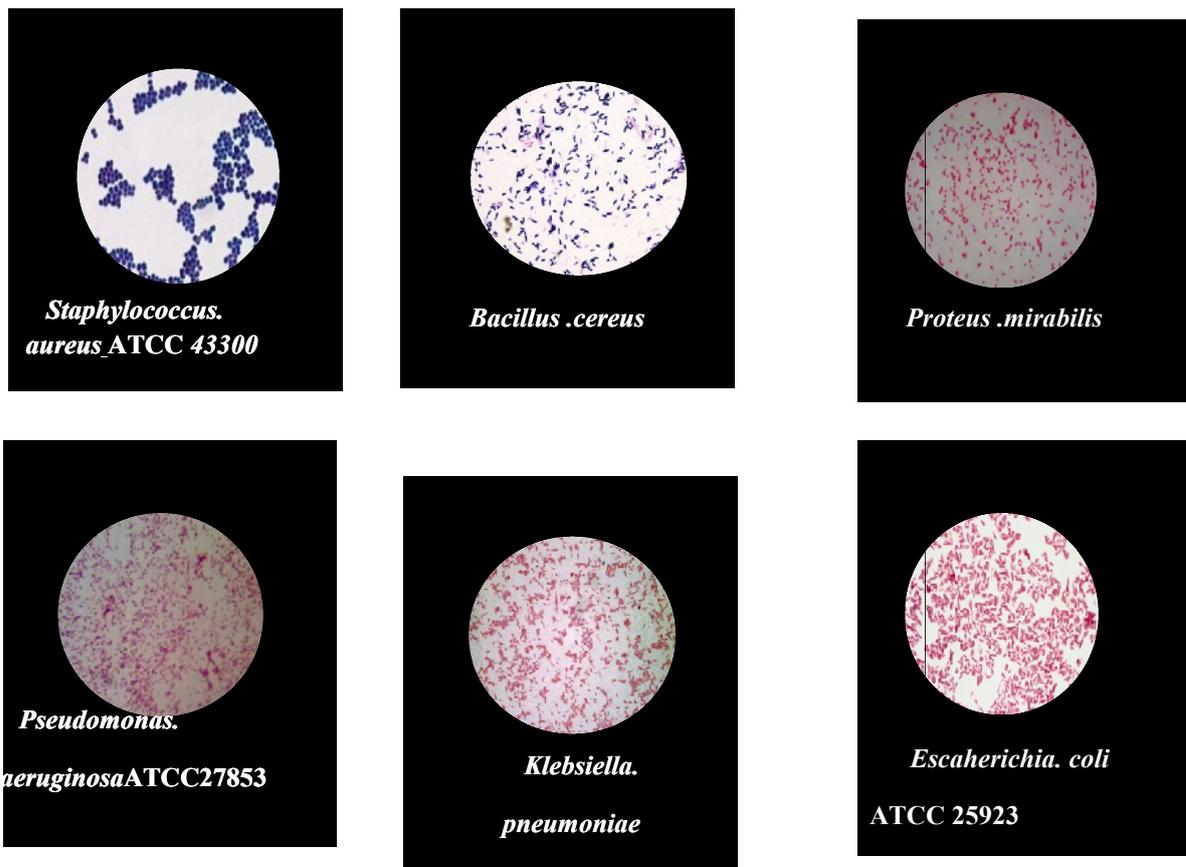


Figure 9: Résultats de la coloration de Gram observée au G×1000 à l'immersion.

I.1.2. Résultats du témoin négatif

Si nos échantillons doivent être soumis aux essais biologiques, la toxicité du solvant peut également être critique car même en traces, le solvant ne devrait pas interférer dans le processus biologique. Pour cela, le DMSO ainsi que l'eau physiologique stérile ont été testés comme diluants. Les résultats montrent qu'ils ne présentent aucun effet sur la croissance des souches microbiennes (Figure 10 et 11).

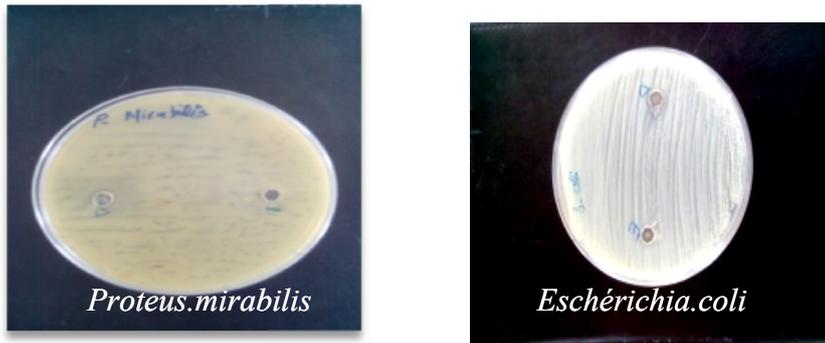


Figure 10: Effet du DMSO et de l'eau physiologique stérile sur quelques bactéries étudiées.



Figure 11 : Résultats du témoin négatif pour la méthode des puits.

I.1.3. Résultats du témoin positif

L'efficacité antibactérienne dans la pratique clinique quotidienne est évaluée in vitro par la mesure de la réaction des agents antimicrobiens dans le milieu de culture, antibiotique par exemple.

Le but de cette étape est de déterminer la sensibilité des souches testées vis-à-vis de cinq antibiotiques synthétiques, choisis par rapport à leur large spectres d'action. Cette sensibilité est exprimée par l'apparition de zones d'inhibition autour des disques. Les résultats sont présentés dans la Figure 12.

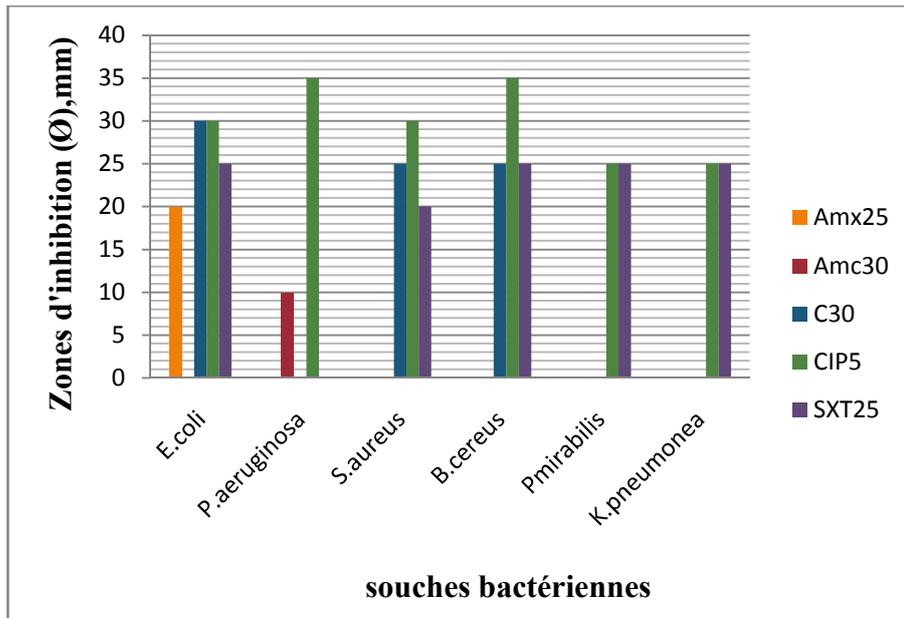


Figure 12: Représentation graphique des résultats de l'antibiogramme effectué sur les souches bactériennes choisies.

Amx25 : Amoxicilline

Amc : Amoxicilline-acide clavulanique

C30 : Chloromphenicol

CIP : Ciprofloxacine

SXT25 : Sulfaméthoxazole + Triméthoprime.

En comparant les valeurs (diamètre des zones d'inhibition) de cette figure, nous remarquons que toutes les souches testées présentent une sensibilité extrême vis-à-vis de ciprofloxacine et développent une résistance contre l'Amoxicilline et l'Amoxicilline-acide clavulanique.

En outre la sulfaméthoxazole manifeste une activité antimicrobienne contre la majorité des souches.

1.1.4. Effet antibactérien des vingt trois substances testées (résultat du screening)

Dans cette partie, nous avons testé à l'état pur l'activité antibactérienne de nos vingt trois complexes chimiques. Les résultats du test sont rassemblés dans la Figure 13.

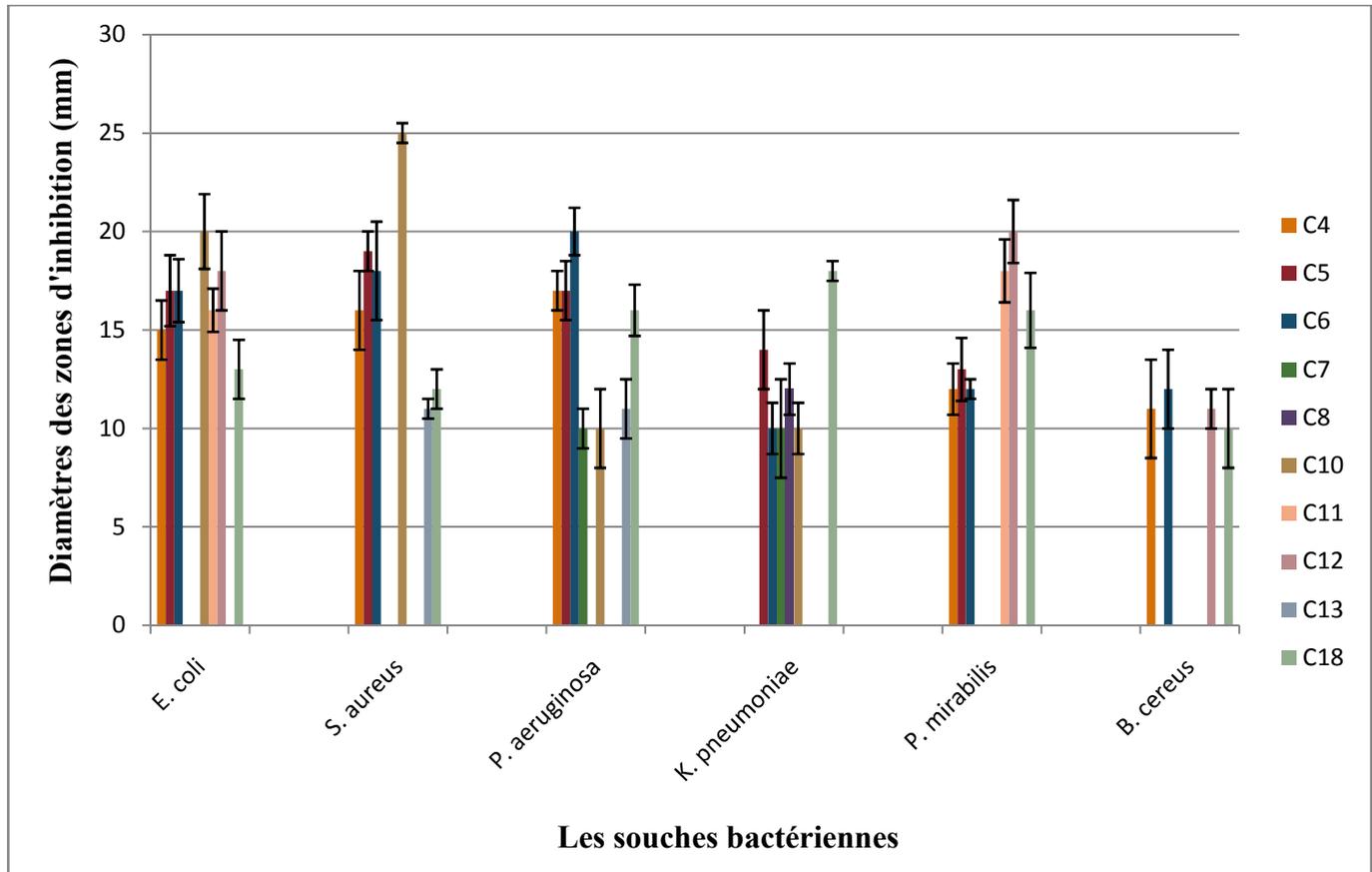


Figure 13: Représentation graphique des résultats du criblage des complexes chimiques

Il ressort de l'histogramme présenté dans la Figure 13 que les complexes chimiques testés sont dotés d'une activité inhibitrice variable selon la bactérie utilisée.

Ainsi, *P.aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 43300, *E. coli* ATCC 25923 se sont montrées plus sensibles en exhibant des diamètres d'inhibition allant de 14 à 25mm obtenus avec un volume de 50 μ l du complexe chimique. Cependant, *B.cereus* s'est révélée moins sensible avec des diamètres allant de 10 à 12mm.

Nous constatons que les complexes de cobalt (C4, C5, C6) sont dotés d'une haute activité inhibitrice sur toutes les souches bactériennes avec une inhibition prononcée chez *S. aureus* et *P. aeruginosa*. Cette observation a été également rapportée par Nadira et al, (1987) et Khadikar et al, (1994), soulignant que les *S. aureus* et *P. aeruginosa* présentent une sensibilité plus élevée que *E coli* vis-à-vis de ces complexes.

Résultats et discussions

En effet, Nadira *et al.*, (1987) et Khadikar *et al.*, (1994) ont souligné qu'en général, les complexes de Co montrent une forte activité inhibitrice contre *S. aureus* et *E. coli* suivi des complexes de Cu et Ni respectivement (Figure 14).

De nombreuses études sur les propriétés antibactériennes des complexes de cobalt ont été reportées dans la littérature, les complexes de Co étant les plus étudiés, vraisemblablement, en raison de leur stabilité aqueuse, de la disponibilité et de la facilité de synthèse (Eddie *et al.*, 2010).

Les diverses études menées sur les propriétés antibactériennes du cobalt mettent souvent l'accent sur l'efficacité accrue de la coordination de cobalt ion à un ligand par rapport au ligand libre lui-même.

Nos tests sur les complexes chimiques à base de fer, ne montrent pas un effet antibactérien important. En effet, des tests microbiologiques préliminaires ont été effectués sur ces complexes. Cependant, selon Azam *et al.* (2012), ces complexes à base de fer n'ont pas d'effets antimicrobiens élevés contrairement aux autres complexes métalliques.

L'effet antimicrobien des complexes de cuivre sur de nombreux organismes a été également rapporté dans divers travaux de recherche (Esteban-Cubillo *et al.*, 2006). Ceci confirme que les complexes à base du cuivre seraient plus efficaces que ceux de fer, en offrant des avantages comme la réduction des coûts et des effets toxiques sur les cellules eucaryotes (Cady *et al.*, 2011).

Des études montrent que l'ADN est endommagé à cause du stress oxydant de Cu. En effet, toutes les études élaborées sur les complexes à base de cuivre confirment que ces derniers étaient constamment cytotoxiques et induisaient plus de dommages sur l'ADN. Cependant, les ions libres de cuivre peuvent endommager les protéines et la membrane à de hautes concentrations (Stohs et Bagchi, 1995).

L'activité antimicrobienne de certains complexes chimiques était significativement plus élevée que les antibiotiques testés (Figure 12). Ceci indique leurs potentiels en tant qu'agents antimicrobiens.

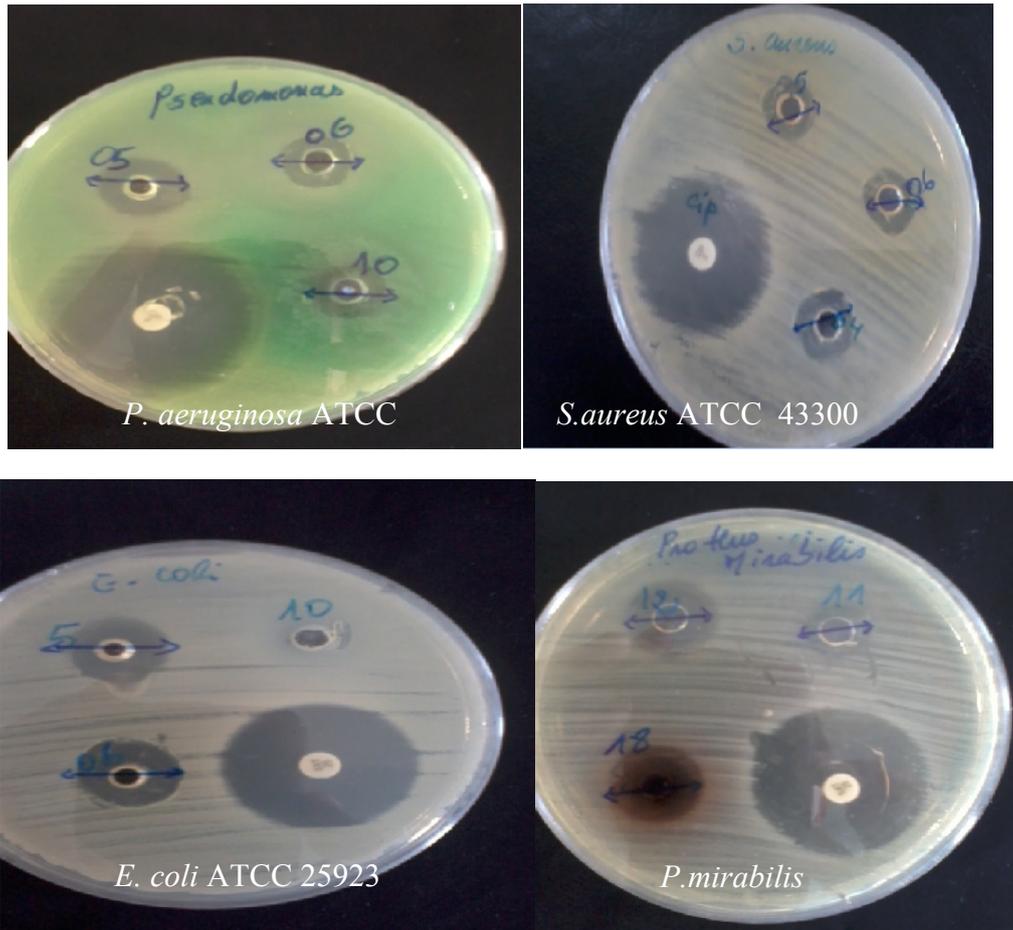


Figure 14 : Effet inhibiteur par la méthode des puits.

I.4.1 Comparaison des diamètres d'inhibition

L'examen des résultats obtenus permet de remarquer que le diamètre d'inhibition est proportionnel au volume déposé. Cependant, il diffère d'un complexe à un autre. Par exemple, pour un volume de 50 μ l de C6 sur la souche *E. coli*, le plus haut diamètre (17 mm) est le plus fort pouvoir inhibiteur. Alors que, le même complexe exhibe un faible effet inhibiteur avec un diamètre de 8mm pour un volume de 20 μ l (Figure 15).

L'activité antibactérienne observée, suit une relation dose-réponse. Cela, nous a donc permis de déterminer les différents paramètres antibactériens à savoir la CMI et la CMB.

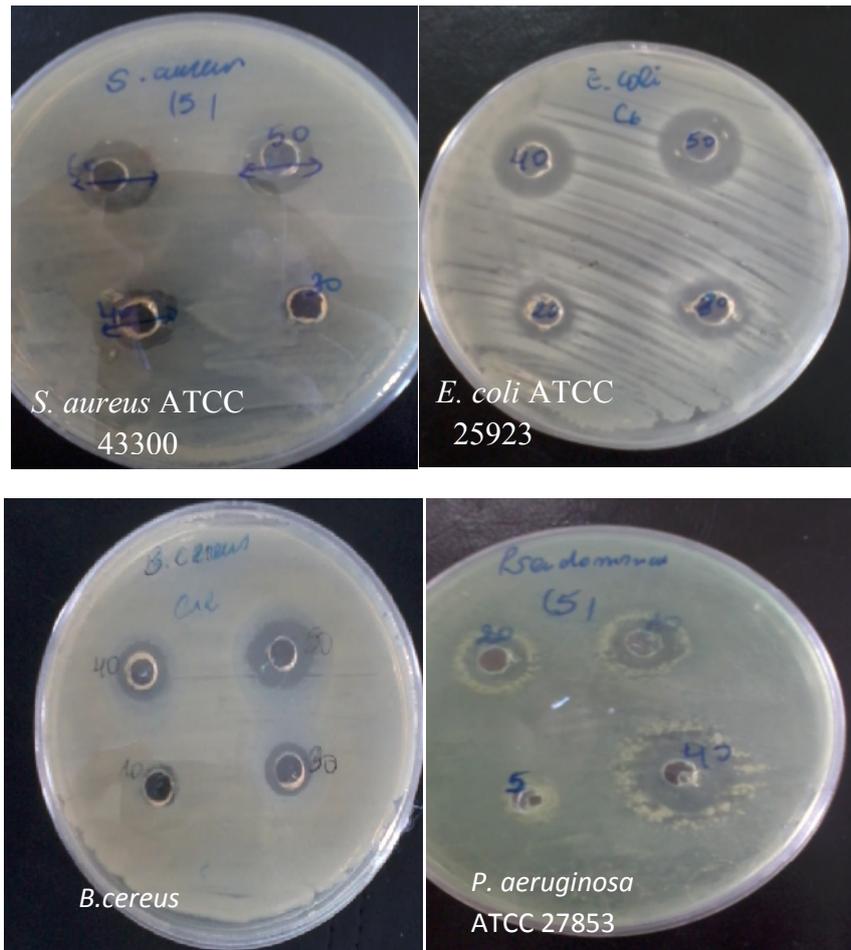


Figure 15 : Relation dose (complexe chimique) et réponse (diamètre d'inhibition) sur les bactéries.

Tableau V: Les complexes chimiques actifs (Etude biologique)

Composés	Masse Molaire	Couleur
C4 = [Co (Hdmg) ₂ (Ura)Cl]	436.763	Gris
C5= [Co (Hdmg) ₂ (Ura)Br]	481.167	Marron
C6= [Co (Hdmg) ₂ (Ura)I]	528.067	Brun-noir
C7= [Cu (Hdmg) (Met)]No ₃	389.77	Bleu ciel
C8= [Cu (Hdmg) ₂ (MET) ₂ Br	523.69	Bleu
C9= Uracil (Ura)	112.09	Blanc
C10= [Cu (Hdmg) ₂ (Met) ₂](Scn) ₂	710	Bleu gris
C Méthionine	149.21	Blanc
C12= [Cu (Hdmg)(Morph) ₂	351.8	Marron
C13= [Ni(Hdmg)(Morph) ₂	346.97	Rose

II. Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices et Bactéricides.

II.1. Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI)

La détermination des CMI des différents agents antimicrobiens testés dans cette étude a été réalisée par la méthode des puits. Cette méthode consiste à mettre en contact les bactéries avec différentes concentrations de particules pendant 24 h. Après ce temps, il est possible de voir la première concentration, qui induit une inhibition des bactéries. Cette concentration est alors la CMI

Plus les CMI sont faibles, plus l'activité antibactérienne des agents testés est meilleure.

Les résultats des tests de CMI des différents agents antimicrobiens testés sur les souches bactériennes sont rapportés dans la Figure 16.

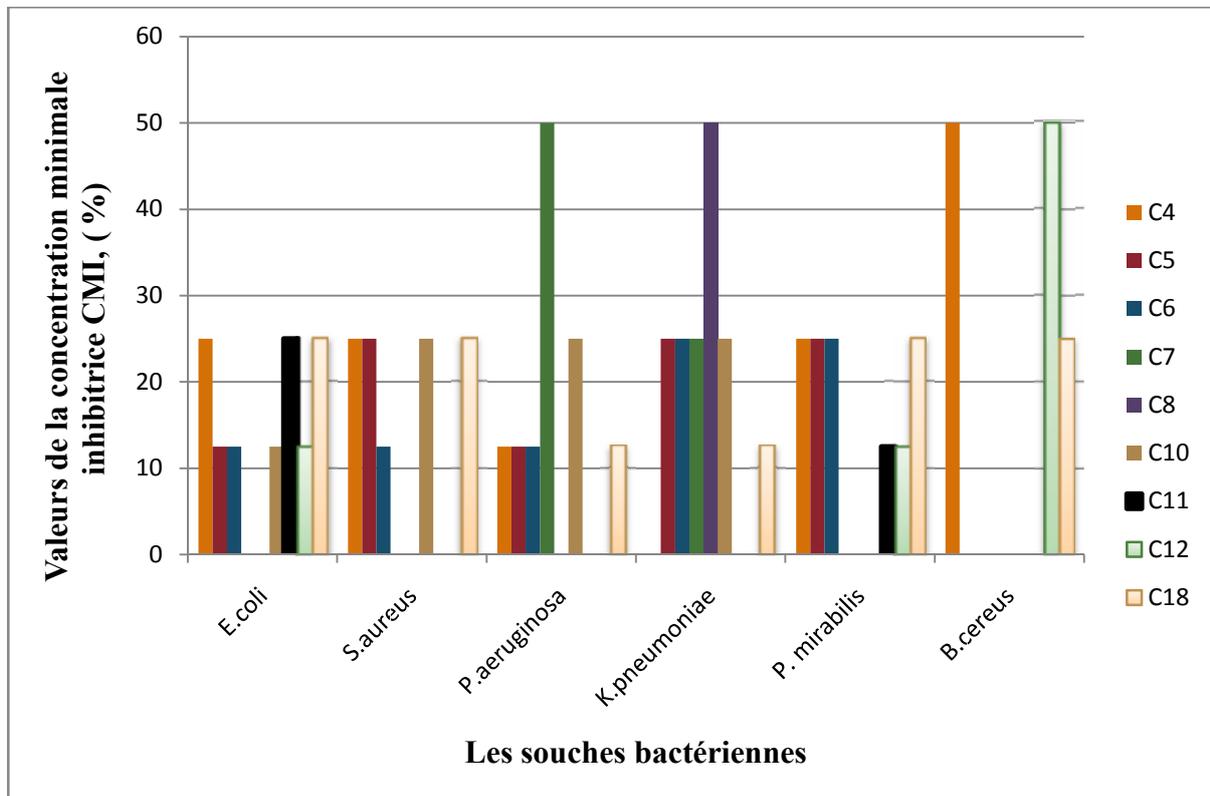


Figure 16 : Représentation graphique des valeurs de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des complexes chimiques (%).

Il ressort de l'histogramme présenté dans la Figure 16 que la plus faible CMI a été obtenue avec les complexes chimiques à base de cobalt, C5 et C6, vis-à-vis d'*E. coli*, *P. aeruginosa* et *S. aureus*, soit 12,5% qui est la quantité infime du complexe incorporée dans le milieu.

Résultats et discussions

Le complexe chimique à base de fer C18 a aussi montré une faible CMI soit, 12,5% vis-à-vis de *P.aeruginosa* et *K. pneumoniae*.

Tandis que la CMI la plus élevée a été enregistrée avec le complexe chimique à base de cobalt C4 et le complexe chimique à base du cuivre C12 vis-à-vis de *B. cereus* soit 50%.

Nous pouvons déduire que les complexes C5, C6, et C18 sont dotés d'une activité antimicrobienne très importante d'autant plus que ces derniers sont efficaces sur les six souches testées.

II.2. Concentrations Minimales Bactéricides (CMB)

Afin de déterminer la nature de l'activité antibactérienne des agents antibactériens testés (effet bactéricide ou bactériostatique), nous avons effectué un repiquage à partir des CMI obtenues sur le milieu MH.

Les résultats du Tableau VI, révèlent la nature de l'activité antibactérienne des différents agents antimicrobiens selon les souches bactériennes.

Tableau VI: Détermination de l'effet bactéricide des différents agents antimicrobiens testés après repiquage sur le milieu MH.

C c \ S B	C4	C5	C6	C10	C11	C12	C18
<i>E.coli</i>	Bcd	bcd	Bcd	Bst	Bst	Bst	Bcd
<i>P.aeruginosa</i>	Bcd	Bcd	Bcd	Bst	Bst	–	Bcd
<i>P.mirabilis</i>	Bcd	Bst	Bcd	–	Bcd	Bst	Bcd
<i>K.pneumoniae</i>	–	Bst	Bcd	–	Bst	–	Bcd
<i>S.aureus</i>	Bcd	Bcd	Bcd	Bst	Bcd	–	Bcd
<i>B.cereus</i>	Bcd	–	–	–	–	Bst	Bst

(-) : non testé (échantillon non actif sur la souche).

(Cc) : complexes chimiques

(Sb) : souches bactériennes

Bcd : effet bactéricide

Bst : effet bactériostatique

L'effet bactéricide le plus important est attribué au complexe à base de cobalt C6 et C18 testés sur toutes les souches qui leur sont sensibles. Ceci confirme les résultats obtenus sur ces derniers, lors des premiers tests.

III. Effets de la combinaison des complexes étudiés

Le but de ce test est de sélectionner les combinaisons actives sur les souches bactériennes étudiées (criblage) dans un moment, et d'étudier l'effet résultant de l'association dans un autre moment.

III.1 Sélection des combinaisons actives sur les souches bactériennes (criblage)

L'évaluation de l'efficacité des complexes chimiques en combinaison a conduit à l'obtention des résultats indiqués dans le Tableau VII.

Tableau VII: Effet de la combinaison entre les complexes chimiques sur la croissance bactérienne

Bactéries Combinaison	<i>E. coli</i>	L'effet	<i>S.aureus</i>	L'effet	<i>P.aeruginosa</i>	L'effet
C4-C5	17mm	Syn	13mm	Ant	18mm	Syn
C4-C6	21mm	Syn	18mm	Syn	20mm	Syn
C4-C9	10mm	Ant	-	Ant	12mm	Ant
C4-C10	11mm	Ant	-	Ant	-	Ant
C5-C6	20mm	Syn	22mm	Syn	21mm	Syn
C5-C9	12mm	Ant	-	Ant	-	Ant
C5-C10	11mm	Ant	-	Ant	-	Ant
C6-C9	18mm	Ind	13mm	Ant	18mm	Ind
C6-C10	20mm	Syn	-	Ant	-	Ant
C11-C12	-	Ant	-	Ant	-	Ant
C4-C11	15mm	Ind	-	Ant	-	Ant
C4-C12	-	Ant	-	Ant	-	Ant
C7-C8	-	Ind	-	Ind	12mm	Syn
C4-C7	-	Ant	-	Ant	14mm	Ind
C4-C8	-	Ant	-	Ant	-	Ant

Bactéries Combinaison	<i>K pneumoniae</i>	L'effet	<i>P mirabilis</i>	L'effet	<i>B cereus</i>	L'effet
C4-C5	9mm	Ant	12mm	Ind	-	Ant
C4-C6	-	Ant	10mm	Ant	-	Ant
C4-C9	9mm	Syn	13mm	Syn	-	Ant
C4-C10	-	Ant	13mm	Ind	10mm	Ant
C5-C6	15mm	Syn	12mm	Ind	13mm	Ind
C5-C9	8mm	Ant	-	Ant	-	Ind
C5-C10	-	Ant	9mm	Ant	-	Ind
C6-C9	-	Ant	-	Ant	-	Ant
C6-C10	-	Ant	-	Ant	-	Ant
C11-C12	-	Ind	-	Ant	9mm	Syn
C4-C11	-	Ind	-	Ind	12mm	Syn
C4-C12	-	Ind	-	Ant	11mm	Ind

Résultats et discussions

C7-C8	12mm	Syn	-	Ind	14mm	Syn
C4-C7	-	Ant	-	Ant	12mm	Syn
C4-C8	-	Ant	-	Ant	11mm	Ind

(Ant) : Antagonisme ; (Ind) : Indifférence ; Syn (synergie)

Selon les résultats du Tableau VII, l'association de deux complexes chimiques exerce un effet combiné variable se traduisant par une synergie, une indifférence ou un antagonisme. La variabilité de l'effet combiné de l'association de complexes chimiques deux à deux illustrée par les diamètres de la zone d'inhibition est présentée dans la Figure 17.

En effet, selon Sharma et *al.*, (2005), les acides aminés, telle que la méthionine, utilisés comme ligands participent souvent à la formation de liaisons hydrogène dans la formation de leurs complexes, ils sont considérés comme agents complexants importants.

Aussi, les composés comportant les bases azotées sont plus intéressants du fait de leur large domaine d'application. Ils jouent particulièrement un rôle significatif dans beaucoup de systèmes biologiques (Olmezet *al.*, 2001).

En général, les complexes à base de Co montrent l'activité inhibitrice la plus importante contre les souches bactériennes suivis des complexes à base de Cu et Ni, et ceci en présence de la Diméthylglyoxime comme ligand principal (Eddie et *al.*, 2008).

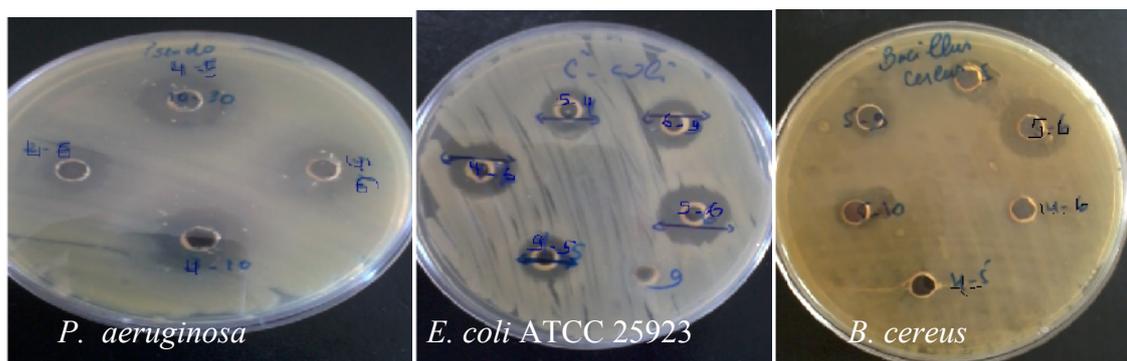


Figure 17 : Photos illustrant l'effet de quelques combinaisons sur les souches bactériennes.

III.2 Combinaisons entre les complexes chimiques exerçant une synergie.

La détermination des concentrations infimes pour lesquelles la combinaison entre deux complexes chimiques reste active sur la souche considérée est rapportée dans les Tableaux VIII ,IX ,X, XI, XII, XII, XIII, XIV, XV, XVI, XVII, XVIII.

a- Combinaison entre le complexe C4 ; [Co(Hdmg)₂(Ura)Cl] et le complexe C5 ; [Co(Hdmg)₂(Ura)Br] sur *E. coli*.

Tableau VIII: Combinaison du complexe C4 versus C5 sur *E. coli*.

Cd en C4 \ Cd en C5	25 %	12,5 %	6,25%	3 %
12,5 %	17mm	15mm	13mm	12mm
6,25%	12mm	10mm	8mm	-
3 %	10mm	8mm	-	-

Cd : Concentrations décroissantes

(-) Absence d'inhibition

Les résultats du Tableau VIII montrent que la combinaison C4 versus C5 a exercé un effet inhibiteur contre *E.coli* bien que nous avons diminué ces dernières au-dessous de leur CMI. Ceci a conduit à un effet synergique dû probablement aux interactions chimiques positives entre les composants de ces deux complexes chimiques.

Il ressort ainsi qu'à une concentration élevée de C5 (12,5%) combinée à une concentration basse du C4 (3%), le diamètre d'inhibition généré est de 12mm. Cependant, à une concentration élevée du C4 (12,5%) combinée à une concentration basse de C5 (3%), le diamètre résultant est de 8mm. Nous déduisons donc que le C5 a un pouvoir inhibiteur plus élevé que le C4.

b- Combinaison entre le complexe C4 ; [Co(Hdmg)₂(Ura)Cl] et le complexe C6 ; [Co(Hdmg)₂(Ura)I] sur *E.coli*.

Tableau IX: Effet de la combinaison du Complexe C4 versus C6 sur *E. coli*.

Cd en C4 \ Cd en C6	25 %	12,5%	6,25%	3 %
12,5%	19mm	16mm	14mm	13mm
6,25%	16mm	11mm	10mm	8mm
3 %	12mm	8mm	-	-

Résultats et discussions

A une concentration du C6 à 12,5 % avec une concentration du C4 à 3 %, le diamètre d'inhibition généré est de 13mm, cependant à une concentration de C4 à 12,5 % avec une concentration de C6 3%, le diamètre résultant est de 8mm.

Aussi, à une concentration de C6 à 6,25% avec une concentration de 3% de C4, le mélange continue à générer un effet inhibiteur, mais ce qui n'est pas le cas à des concentrations inverses.

Nous déduisons donc que le C6 a un pouvoir inhibiteur plus élevé que le C4 sur la souche *E.coli*.

c- Combinaison entre le complexe C5 ; [Co(Hdmg)₂(Ura)Br] et le complexe C6 ; [Co(Hdmg)₂(Ura)I] sur *E.coli*.

Tableau X : Effet de la combinaison du Complexe C5 versus C6 sur *E. coli*

Cd en C5 \ Cd en C6	12,5%	6,25%	3 %
12,5%	18mm	16mm	13mm
6.25%	13mm	10mm	8mm
3 %	10mm	8mm	-

A une concentration de C6 à 12,5 % combinée à une concentration de C5 à 3 %, le diamètre d'inhibition généré est de 13mm, cependant pour des concentrations inverses, le diamètre résultant est de 10mm.

Par déduction, le C6 a un pouvoir inhibiteur plus élevé que le C5 sur la souche *E. coli*.

d- Combinaison entre le complexe C4 ; [Co(Hdmg)₂(Ura)Cl] et le complexe C6 ; [Co(Hdmg)₂(Ura)I] sur *S.aureus*

Tableau XI : Effet de la combinaison du Complexe C4 versus C6 sur *S.aureus*

Cd en C4 \ Cd en C6	25%	12,5 %	6,25 %	3%
12,5%	19mm	18mm	13mm	12mm
6,25%	15mm	15mm	8mm	-
3%	11 mm	9mm	-	-

A une concentration du C6 à 12,5 % avec une concentration de C4 à 3 %, le diamètre d'inhibition généré est de 12mm, cependant pour des concentrations inverses le diamètre résultant est de 9mm. Ceci indique donc que le C6 a un pouvoir inhibiteur plus élevé que le C5 sur la souche *S. aureus*.

e- Combinaison entre le complexe C4 ; [Co(Hdmg)₂(Ura)Cl] et le complexe C10 ; [Cu(Met)₂](SCN)₂(Hdmg)₂ sur *S. aureus*

Tableau XII: Effet de la combinaison du Complexe C4 versus C10 sur *S.aureus*

Cd en C10 \ Cd en C4	25 %	12,5 %	6,25%	3%
12,5%	20mm	17mm	15mm	13mm
6,25 %	16mm	12mm	9mm	11mm
3%	16mm	10mm	8mm	-

A une concentration de C4 à 12,5 % avec une concentration de C10 à 3 %, le diamètre d'inhibition généré est de 13mm, mais pour des concentrations inverses de ces complexes le diamètre généré est de 10mm. D'où alors, le C4 a un pouvoir inhibiteur plus élevé que le C10 sur la souche *S. aureus*.

f- Combinaison entre le complexe C6; [Co(Hdmg)₂(Ura)I] et le complexe C10 ; [Cu(Met)₂](SCN)₂(Hdmg)₂ sur *S. aureus*.

Tableau XIII : Effet de la combinaison du Complexe C6 versus C10 sur *S.aureus*

Cd en C6 \ Cd en C10	12,5 %	6,25 %	3 %
25 %	18mm	15mm	12mm
12,5%	16mm	12mm	10mm
6,25 %	15mm	10mm	-
3 %	13mm	8 mm	-

A une concentration de C6 à 12,5 % avec une concentration du C10 à 3 %, le diamètre d'inhibition généré est de 13mm, cependant à une concentration de C10 à 12,5 % avec une concentration de C6 3%, le diamètre résultant est de 10mm.

Nous déduisons donc que le C6 a un pouvoir inhibiteur plus élevé que le C10 sur la souche *S.aureus*.

g-Combinaison entre le complexe C4 ; [Co(Hdmg)₂(Ura)Cl] et le complexe C5 ; [Co(Hdmg)₂(Ura)Br] sur *P. aeruginosa*.

Tableau XIV : Effet de combinaison du Complexe C4 versus C5 sur *P.aeruginosa*.

Cd en C4 \ Cd en C5	12,5%	6,25%	3 %
12,5 %	16mm	15mm	13mm
6,25%	10mm	9mm	8mm
3%	8mm	-	-

Résultats et discussions

A une concentration de C5 à 12,5 % avec une concentration basse de C4 à 3 %, le diamètre d'inhibition généré est de 13mm, mais pour des concentrations inverses de ces complexes le diamètre généré est de 8mm. Par déduction, le C5 a un pouvoir inhibiteur plus élevé que le C4 sur la souche *P. aeruginosa*.

h- Combinaison entre le complexe C4 ; [Co(Hdmg)₂(Ura)Cl] et le complexe C6 ; [Co(Hdmg)₂(Ura)I] sur *P.aeruginosa*.

Tableau XV : Effet de la combinaison du Complexe C4 versus C6 sur *P. aeruginosa*.

Cd en C4 \ Cd en C6	12,5%	6,25%	3%
12,5 %	20mm	16mm	13mm
6,25 %	13mm	10mm	9mm
3%	8mm	-	-

A une concentration de C6 à 12,5 % avec une concentration de C4 à 3 %, le diamètre d'inhibition généré est de 13mm, mais pour des concentrations inverses de ces complexes le diamètre généré est de 8mm.

Nous déduisons donc que le C6 a un pouvoir inhibiteur plus élevé que le C4 sur la souche *P.aeruginosa*.

i- Combinaison entre le complexe C5 ; [Co(Hdmg)₂(Ura)Br] et le complexe C6 ; [Co(Hdmg)₂(Ura)I] sur *P. aeruginosa*

Tableau XVI : Effet de la combinaison du Complexe C5 versus C6 sur *P.aeruginosa*.

Cd en C5 \ Cd en C6	12,5%	6,25%	3%
12,5 %	18mm	16mm	13mm
6,25%	11mm	10mm	8mm
3%	10mm	-	-

A une concentration de C6 à 12,5 % avec une concentration de C5 à 3 %, le diamètre d'inhibition généré est de 13mm, mais pour des concentrations inverses de ces complexes le diamètre généré est de 10mm. C6 a donc un pouvoir inhibiteur plus élevé que le C5 sur la souche *P. aeruginosa*.

III.2. Combinaison de l'HE de thym avec le complexe chimique C6 :

[Co(Hdmg)₂(Ura)I]

L'effet combiné de la combinaison de l'HE de thym avec le complexe chimique C6 est illustré dans les Tableaux XII, XIII, XIX:

TableauXII : Combinaison de l'HE de thym avec le complexe chimique C6 sur *P.aeruginosa*.

Cd en HET	0,25%	0,16%	0,083%
Cd en C6			
12,5 %	20mm	16mm	14mm
6,25%	18mm	13mm	10mm
3%	12mm	11mm	8mm

TableauXIII : Combinaison de l'HE de thym avec le complexe chimique C6 sur *E.coli*

Cd en HET	0,25%	0,16%	0,083%
Cd en C6			
12,5 %	16mm	13mm	12mm
6,25%	15mm	14mm	10mm
3%	10mm	11mm	8mm

TableauXIX : Combinaison de l'HE de thym avec le complexe chimique C6 sur *S. aureus*

Cd en HET	0,25%	0,16%	0,083%
Cd en C6			
12,5 %	18mm	16mm	13mm
6,25%	14mm	13mm	10mm
3%	10mm	11mm	8mm

Les résultats du Tableau XII, XIII, XIX montrent un pouvoir inhibiteur de la combinaison HE de thym/ complexe chimique à base de cobalt même à des concentrations inférieures de leur CMI, ce qui traduit la présence d'un effet synergique entre eux.

Selon Musiol *et al.* (2014), cette observation peut s'expliquer par la formation de nouvelles molécules lors de la combinaison auxquelles les germes ne sont pas encore adaptés, ce qui peut régler le problème de la résistance.

De cette étude qui a pour but d'évaluer *in-vitro* l'activité antibactérienne des complexes chimiques sur six souches bactérienne, il ressort que:

- Les souches étudiées ont été sensibles à dix complexes chimiques parmi les vingt-trois complexes testés.
- Les complexes chimiques à base de cobalt ont montré le pouvoir inhibiteur le plus important sur toutes les souches étudiées.
- Les complexes chimiques ont exercé un effet inhibiteur sur la croissance bactérienne suivant une relation dose-réponse.
- Certains complexes chimiques ont présenté un pouvoir inhibiteur lors de leur combinaison à des concentrations inférieures à leur CMI, ce qui traduit la présence d'un effet synergique entre eux.
- L'association de l'HET avec le complexe chimique C6 a montré également un effet synergique.

Nos résultats restent préliminaires et méritent une étude plus approfondie en considérant les aspects suivants :

- Les ligands méritent d'être étudiés de façon plus approfondie dans la perspective de les utiliser comme intermédiaires dans certaines réactions ainsi que comme agents complexants des métaux de transition.
- Le ligand H₂dmg utilisé comme ligand principal dans notre étude offre d'excellents résultats de complexation avec les ions métalliques. Il serait donc intéressant d'élargir leur utilisation.
- Tester ces combinaisons sur d'autres souches pathogènes impliquées dans la détérioration des aliments et les intoxications alimentaires.
- Elucider les mécanismes moléculaires des combinaisons et leur spectre d'activité.
- Il serait également très intéressant d'élargir l'utilisation des combinaisons à l'échelle industrielle en les adoptant comme additifs pour conserver les denrées alimentaires.

La sensibilité des différentes souches aux complexes chimiques revêt une grande importance dans le traitement des pathologies qui leur sont associées. Cette étude permet de justifier le bien fondé des vertus antimicrobiennes accordées à ces complexes.

Nous pouvons noter qu'avec la progression de la recherche sur les complexes chimiques, il serait vraisemblablement possible d'améliorer prochainement la situation clinique des patients. Toutefois, pour y arriver, il reste encore à résoudre de nombreuses questions comme la sécurité des complexes chimiques devant être prouvée par études toxicologiques adéquates.

A

- **APROTOSOAIE A.C., SPAC A.D., HANCIANU M., MIRON A., TANASESCU V.F., DORNEANU V., STANESCU U. (2010).** The Chemical Profile of Essential Oils Obtained from Fennel Fruits (*Foeniculum vulgare* Mill.). *FARMACIA*, 58 (1), 46-54.
- **ATKINS P. and JONES L. (1997).** Matter and Change ; Chemistry, Molecules; Ed: WH. Freeman & Co Ltd.
- **AVRIL J-L. et FAUCHERE J-L. (2002).** Bactériologie Générale et Médicale. Ed Ellipses. P, 141.
- **AZZAM A., AHMED A. S., OVES M., KHAN M. S., HABIB S. S., and MEMIC A. (2012).** Antimicrobial Activity of Metal Oxide Nanoparticles Against Gram-positive and Gram Negative Bacteria: A Comparative Study. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 6003- 6009.

B

- **BAG A., CHATTOPADHAY R.R. (2015).** Evaluation of Synergistic Antibacterial and Antioxidant Efficacy of Essential Oils of Spices and Herbs in Combination. e0131321.
- **BEN OMAR N., ABRIOUEL H., LUCAS R., MARTINEZ-CAÑAMERO M., GUYOT J. P., GÁLVEZ A. (2006).** Isolation of Bacteriocinogenic *Lactobacillus Plantarum* Strains From Ben Saagla, a Traditional Fermented Gruel From Burkina Faso. *Int. J. Food Microbiol*, 112, 44-50.
- **BING-YIN J., XIE F., WEI-DONG J., CHANG-WEI H. and XIAN-CHENG Z. (2004).** *Journal of Dispersion Science and Technology*. 25(2), 139-147.
- **BIRSEN S., BUYUKTAS. and OZGUR A. (2006).** *Transition Metal Chemistry*. 31, 56-61
- **BOUDESOCQUE S., DAMAJ Z.B., DUPONT L., BEHRC J.B. and GUILLON A.B. (2008).** *Journal of Inorganic Biochemistry*, 102, 1514–1522.
- **BUCHMAN G. W., BANERJEE S. and HANSEN J.N (1988).** Structure Expression and Evolution of a Gene Encoding the Precursor of Nisin, a Small Protein Antibiotic. *Journal of Biological Chemistry*. 263(31), 16260-6.
- **BURT S. (2004).** Essential Oils: Their Antibacterial Properties and Potential Applications in Foods. *International Journal of Food Microbiology*. 94, 223-253.

C

- **CADY N. C., BEHNKE J. L., & STRICKLAND A. D. (2011).** Copper-Based Nanostructured Coatings on Natural Cellulose: Nanocomposites Exhibiting Rapid and Efficient Inhibition of a Multi-Drug Resistant Wound Pathogen, *A. baumannii*, and Mammalian Cell Biocompatibility in Vitro. *Advanced Functional Materials*, 21(13), 2506-2514.
- **CAILLET S., LACROIX M. (2007).** Les Huiles Essentielles: Leurs Propriétés Antimicrobiennes et Leurs Applications Potentielles en Alimentaire. Laboratoire de Recherche en Sciences Appliquées à l'Alimentation (RESALA) INRS-Institut Armand-Frappier, Université de Laval (Québec).
- **CHATTERJEE P.K. (2006).** Intracellular Gene Expression Profile of *Listeria monocytogenes*, *Infection and Immunity*. vol,74, 1323-1338.

- **CHOI H-S., SONG H.S., UKEDA H., and SAWAMURA M. (2000).** Radical Scavenging Activities of Citrus Essential Oils and Their Components: Detection Using 1, 1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl. *J. Agric.*
- **COROPCEANU E., CROITOR L., GDANIEC M., WICHER B., FONARI., (2009).** *Inorganica Chimical*, 362, 2151-2158.
- **COX S D., MANN C.M., MARKHAM J.L., BELL H.C., GUSTAFSON J.E., WARMINGTON J.R. and WYLLIE S.G. (2000).** The Mode of Antimicrobial Action of the Essential Oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J. Appl. Microbiol*, 88,170- 175.
- **COX S.D., MANN C.M. and MARKHAM J.L. (2001).** Interactions between Components of the Essential Oil of *Melaleuca alternifolia*. *J. Appl. Microbiol*, 91, 492–497.
- **CRISTIANI M., DIARNIGO M., MANDALARI G., CASTELLI F., SARPIETRO M. G et MICILI D. (2007).** Interaction of Four Monoterpenes Contained in Essential Oils.
- **CZERWORKA D. (2016).** Structure-Activity Relationship studies of New Rifamycins Containing l-Amino Acid Esters as Inhibitors of Bacterial RNA Polymerases. *Eur J Med chem.*

D

- **DAKHEL A.A., ALI.MOHAMED Y., HENARI A.F. (2006).** *Optical Materials* 28, 925-929.
- **DE BILLERBECK V.G., ROQUES C., VANIERE P., et MARQUIER P., (2002).** Activité Antibactérienne et Antifongique de Produits à Base d'Huiles Essentielles. *Rev, hygiènes.* 10(3), 248.
- **DEDIEU A. (1992).** Transition Metal Hydrides VCH. *Physico-Chimie Inorganique: Une Approche Basée sur la Chimie de Coordination.* Newyork.
- **DEEGAN L.H., COTTER P.D., HILL C. et ROSS P. (2006).** Bacteriocins: Biological Tools for Bio-Preservation and Shelf-Life Extension. *Int. Dairy J.*, 16, 1058-1071.
- **DELARRAS C. (2007).** *Microbiologie Pratique pour le Laboratoire d'Analyses ou de Contrôle Sanitaire.* Edition TEC& DOC. Lavoisier.
- **DJENADI F. (2011).** Contribution à l'Etude de l'Activité Antimicrobienne du Genévrier (*Juniperus phoenicea*): Essai des Huiles Essentielles et Composés Phénoliques Université A Mira de Béjaia Algérie - Master en biologie option biochimie appliquée.
- **DORTU C. et THONART P. (2009).** Les Bactériocines des Bactéries Lactiques : Caractéristiques et Intérêt pour la Bioconservation des Produits Alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, 13,143-154.

E

- **EDDIE L., CHANG L., CHRISTA SIMMERS E. and ANDREW D. (2010).** Pharmaceuticals. Review Cobalt Complexes as Antiviral and Antibacterial Agents 3, 1711-1728.
- **EL-GAHAMI MOHAMED A., ZAHER A., KHAFAGY AZZA M.M., and NABWIA M.I. (2004).** *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers.* 14 (2), 117-129.
- **ESTEBAN-CUBILLO A., PECHARROMAN C., AGUILAR E., SANTAREN J. & MOYA J. S. (2006).** Antibacterial Activity of Copper Monodispersed Nanoparticles into Sepiolite. *Journal of Materials Science*, 41(16), 5208-5212.

- **EVANDRO L. S., JEFERSON C.B., MARIA L.C., NELSON J.G.N., ANA C.V.C. (2009).** Combined Application of Origanum Vulgare Essential Oil and Acetic Acid for Controlling the Growth of *Staphylococcus aureus*. Brazilian Journal of Microbiology.

F

- **FABER F., EGLI T. et Harder W. (1993).** Transient Repression of the Synthesis of OmpF and Aspartate Transcarbamoylase in *Escherichia coli* K12 as a Response to Pollutant Stress. FEMS Microbiol Lett 111, 189–195.
- **FAY M., WILBUR S., ABADIN H., INGERMAN L., SWARTS S. G., RESEARCH S. (2005).** Toxicological Profile for Nickel. Ed, U.S. p: 1-185. Foda M.I., El-Sayed M.A.
- **FRANCHOMME P. et PENOËL D. (2001).** Comparaison en Sept Points entre les Antibiotiques et les Huiles Essentielles. De l'Aromathérapie. 232, 233-448.
- **FRERE J. M. (2008).** Antibiotiques Contre Bactéries. The lancet. Reflexions, le site de vulgarisation de l'Université de Liège.

G

- **GATTI D., MITRA B. and ROSEN B. P. (2000).** "Escherichia coli Soft Metal Ion-Translocating ATPases." J Biol Chem 275(44), 34009-12.
- **GERLOCH M. (2000).** Transition Metal Chemistry, Editions VCH; Weinheim, New York, Tokyo, 211.
- **GILLOR O., ETZION A. et RILEY M. A. (2008).** The Dual Role of Bacteriocins as Anti- and Probiotics. Appl. Microbiol. Biotechnol, 81, 591-606.
- **GRATIA. (1925).** Sur un Remarquable Exemple d'Antagoniste entre Souches Colibacilles. Conseil Royal Société Biologie. 93, 1040-1041.
- **GRYSOLE J. (2004).** La Commercialisation des Huiles Essentielles. Manuel Pratique des Huiles Essentielles : de la Plante à la Commercialisation, 139-141.
- **GUESMI A., BOUDABOUS A. (2006).** Activité Antimicrobienne de Cinq Huiles Essentielles Associées dans les Produits de Thalassothérapie- les Plantes à Parfum Aromatiques et Médicinales. Faculté des Sciences de Tunis, Université Tunis - El Manar, 2092, Tunis.
- **GUINOISEAU E. (2010).** Molécules Antimicrobiennes Issues des Huiles Essentielles : Séparation, Identification et Mode d'Action. Thèse de doctorat de Corse.

H

- **HAMMER K.A., CARSON C. F. et RILEY T.V. (1999).** Antimicrobial Activity of Essential Oils and Other Plant Extracts. *J. Appl. Microbiology*. 86, 985-990.
- **HAMMER K.A., CARSON C.F. (2011).** Antibacterial and Antifungal Activities of Essential Oils in Thormar H. Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents. Edition John Wiley & Sons, Ltd, 255-295. United Kingdom.
- **HASSAN A.A., RASMY N.M. and EI-MOGHAZY M.M (2010).** Effect of Spearmint Essential Oil on Chemical Composition and Sensory Properties of White Cheese. *Journal of American Science*; 6 (5), 272-280.
- **HASSAN M., KJOS I.F., NES D.B. DIEP. and LOTFIPOUR F. (2012).** « Natural Antimicrobial Peptides from Bacteria: Characteristics and Potential Applications to Fight against Antibiotic Resistance», *J Appl Microbiol*, vol. 113, 723-736.

- **HENG.N.C.K et TAGG.J.R. (2006).** What's in a Name ? Class Distinction for Bacteriocins. *Nat. Rev.Microbiol.* (4).
- **HENG N. C. K., WESCOMBE P. A., BURTON J. P., JACK R. W., and TAGG J. R. (2007).** The Diversity of Bacteriocins in Gram-Positive Bacteria. In: Riley, M. A., and Chavan, M.(Eds). *Bacteriocins: Ecology and Evolution.* Springer Verlag. Berlin Germany. 45-92.
- **HOBMAN J., YAMAMOTO K., et OSHIMA T. (2007).** Transcriptomic Responses of Bacterial Cells to Sublethal Metal Ion Stress. *Molecular Microbiology of Heavy Metals* : 73–115.
- **HORVATH G., JENEI J.T., VAGVOLGYI C., BOSZORMENYI A., KRISCH J. (2016).** Effects of Essential Oil Combinations on Pathogenic Yeasts and Moulds. *Acta Biol Hung.*67 (2):205-14. doi: 10.1556/018.67.

J

- **JAMIESON E.R. and LIPPARD S.J. (1999).** Structure, Recognition and Processing of Cisplatin-DNA Adducts; *Chem Rev*, 99, 2467-2498.

K

- **KHADIKAR P.V., SAXENA R., KHADDAR T., FERAQIUMA (1994).** Salicylhydroxamic Acid and their Metal Chelates as Antifungal Agents. *J. Indian Chem. Soc.*, 56: 215.
- **KETTLE S. F. A. (1999).** *Physico-Chimie Inorganique ; Une Approche Basée sur la Chimie de Coordination*, De Boeck Université, Paris.

L

- **Li X., WEI Z., ZHANG M., PENG X., YU G., TENG M. and GONG W. (2007).** "Crystal Structures of *E. coli* laccase CueO at Different Copper Concentrations." *Biochem Biophys Res Commun* 354(1), 21-6.
- **LIMONET M., REVOL-JUNELLES A. M. et J. B. MILLIÈRE (2002).** Variations in the Membrane Fatty Acid Composition of Resistant or Susceptible *Leuconostoc* or *Weissella* Strains in the Presence or Absence of Mesenterocin 52A and Mesenterocin 52B produced by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52. *Applied and Environmental Microbiology.* 68(6), 2910-6.
- **LIMONET M., CAILLIEZ-GRIMAL C., LINDER M., REVOL-JUNELLES A. M. et MILLIÈRE J. B. (2004),** Cell Envelope Analysis of Insensitive, Susceptible or Resistant Strains of *Leuconostoc* and *Weissella* Genus to *Leuconostoc mesenteroides* FR 52 Bacteriocins. *FEMS Microbiology Letters* 241(1), 49-55.
- **LI Z. S., Lu Y. P., ZHEN R. G., SZCZYPKA M., THIELE D. J. and REA P. A. (1997).** "A New Pathway for Vacuolar Cadmium Sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1- Catalyzed Transport of Bis(glutathionato) Cadmium." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(1), 42-7.
- **LOSADA J., DEL PESO I. and BEYER L. (2001).** *Inorganica Chemica Acta.* 321, 107-115.
- **LUKTENHAUSJ. F. (1977).** Role of a Major Outer Membrane Protein in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 131,631–7.

- **LUSSIER-PRICE M. (2008).** Les Bactériocines Contre la Résistance Bactérienne. Laboratoire : Dr. James G. Omichinski. Université de Montréal.

M

- **MA Z., JACOBSEN F. E., et GIEDROC D. P. (2009)** Coordination Chemistry of Bacterial Metal Transport and Sensing. *Chem Rev* 109, 4644–4681.
- **MADIGAN M., MARTINKO J. (2007).** Brock-Biologie des Microorganismes. Pearson Education, 11^{ème} Ed., France. P 1047.
- **MAHMOUD B. S. M., YAMAZAKI K., MIYASHITA K., IL-SHIK S., DONG-SUK C., SUZUKI T. (2004).** Bacterial Microflora of Carp (*Cyprinus carpio*) and its Shelf-Life Extension by Essential Oil Compounds. *Food Microbiology* 21, 657-666.
- **MAMI A., HENNI J. E et KIHAL M. (2008).** Antimicrobial Activity of Lactobacillus Species Isolated from Algerian Raw Goat's Milk Against *Staphylococcus aureus*. *World J. Dairy et Sci.*, 3, 39-49.
- **MEHMET., and SELAHATTIN S. (2006).** Transition Metal Chemistry. 31, 805-812.
- **MEYER A., DEIANA J ET BERNARD A. (2004).** Biosciences et Techniques. EdDOIN. P304. France.
- **MING X. and M. A. DAESCHEL. (1993),** Nisin Resistance of Foodborne Bacteria and the Specific Resistance Responses of *Listeria monocytogenes* ScottA. *Journal of Food Protection.* 56, 11, 944- 948.
- **MOON H., RHEE MS. (2016).** Synergism Between Carvacrol or Thymol Increases The Antimicrobial Efficacy of Soy Sauce With no Sensory Impact. *Microbioly Food.* 18,217,35-41.
- **MUNEREERA M.S. (2016).** Design, Synthesis, Structural Elucidation, Pharmacological Evaluation of Metal Complexes with Pyrazoline Derivation. *J Photochim Photobi*
- **MUSIOL R., MROZEK-WILCZKIEWICZ A. and POLANSKI J (2014).** Synergy Against Fungal Pathogens: Working Together Is Better Than Working Alone. *Curr. Med. Chem.* March 2014; 21(7); pp: 870-893.

N

- **NADIRAW., SINGH H.B., GAJANA A., RAICHOWDHARY A.V (1987).** Synthesis of Metal Complexes of Antimalaria Drugs and in Vitro Evaluation of their Activity Against *Plasmodium falciparium*. *Inorg. Chim. Acta*, 135: 133- 137. Nakamot.
- **NELSON N. (1999).** "Metal Ion Transporters and Homeostasis." *Embo J* 18(16), 4361-71.
- **NEWMAN DJ., CRAGG GM. et SNADER KM.(2003)** . Natural Products as Sources of New Drugs Over The Period 1981-2002. *J. Nat. Prod.* 66, 1022-1037.
- **NIES, D. H. (1999).** "Microbial Heavy-Metal Resistance." *Appl Microbiol Biotechnol*, 51(6), 730-50.
- **NOYCE J. O., MICHELS H., KEEVIL C.W. (2006).** Use of Copper Cast Alloys to Control *Escherichia coli* O157 Cross-Contamination During Food Processing. University of Southampton, Biomedical Sciences Building, Bassett Crescent Eas.

P

- **PERRY J.J., STALEY J.T. et LORY S. (2004).** Microbiologie. Ed Dunod.Paris.P891.
- **PEYRON L. et NAVES Y.R. (1977).** Lexique des Termes et Expressions Utilisées dans les Industries des Matières Premières Aromatiques. (les huiles essentielles). Rivista italiana. E.P.P.O.S, 59, 550-564.
- **PIBIRI M.C. (2005).** Assainissement Microbiologique de l'air et des Systèmes de Ventilation au Moyen d'Huiles Essentielles. Thèse de doctorale. Ecole Poly Technique Fédérale, EPFL. Lausanne (Suisse).
- **PONCE A.G., FRITZ R., DEL VALLE C. and ROURA S.I. (2003).** Antimicrobial Activity of Essential Oils on the Native Micro-Flora of Organic. Swiss, Chard. 36, 679– 684
- **POOLE K. (2002).** Mechanisms of Bacterial Biocide and Antibiotic Resistance. Journal Application Microbiol 92, P 55-64.
- **PRADYOT P. (2003).** Handbook of Inorganic Chemicals, McGraw-Hill.

R

- **RABINDA REDDY P., RADHIKA M. and MANJULA P. (2005).** J. Chem.Sci. 117(3) 239-246.
- **RAYOUR. (2003).** Mechanism of Bactericidal Action of Oregano and Clove Essential Oils and of their Phenolic Major Components in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. The Journal of Essential Oil Research. 86, 985-990.
- **RECKHIF N., ATRIH A. et LEFEBVRE G. (1994).** Selection and Properties of Spontaneous Mutants of *Listeria Monocytogenes* ATCC 15313 Resistant to Different Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria Strains. Current Microbiology. 28, 237- 241
- **REDDY K., YEDERY RD. et ARANHA C. (2004).** Antimicrobial Peptides: Premises and Promises. Int J. Antimicrob Agents. 24, 536-547.
- **REN G., HU D., CHENG E. W., VARGAS-REUS M. A., Reip P., & ALLAKER R. P. (2009).** Characterisation of Copper Oxide Nanoparticles for Antimicrobial Applications. International Journal of Antimicrobial Agents, 33(6), 587-590.
- **RIGO A., CORAZZA A., PAOLO D., ROSSETTO M.L., UGOLINI R. et SCARPA M. J. (2004).** Inorg. Biochem, 98, 1459-1501.
- **Robinson N., Whitehall S. et Cavet J. (2001).** Microbial Metallothioneins. Advances in Microbial Physiology 44, 183–213.

S

- **SANTOYO S., CAVERO S., JAIME L., IBANEZ E., SENORANS FJ., REGLERO G. (2005).** Chemical Merck Index, An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biological, 13th edition, United Metabolomics Standards Initiative (MSI).Metabolomics 3 (3),211-221.
- **SASS P., A. JANSEN C. SZEKAT V. SASS H.G. SAHL, and BIERBAUM G. (2008).** The Lantibiotic Mersacidin Is a Strong Inducer of the Cell Wall Stress Response of *Staphylococcus aureus* , BMC Microbiol, vol, (8), p. 186.
- **SCOTT J. et PALMER S. (1988).** Cadmium Bio-Sorption by Bacterial Exopolysaccharide. Biotechnology letters 10, 21–24.
- **SCOTT J. and BRADBURY R. (1994).** Pharmacokinetic Dosing of Carbo Platin; Fla J Hosp Pharm, 14, 17-18.

- **SHRIVER .D.F. et ATKINS P.W. (2001).** Chimie Inorganique, Traduction Française, De Boeck Université, Paris.
- **SIENKIEWICZ M. (2017).** The Ability of Selected Plant Essential Oils Enhance the Action of Recommended Antibiotics against Pathogenic Wound Bacteria. Burns.
- **SILVA N., FERNANDES JUNIOR A. (2010).** Biological Properties of Medicinal Plants: a Review of Their Antimicrobial Activity .J.Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases, 402-413.
- **SINGH SB., BARRET J.,F. (2006).** Empirical Antibacterial Drug Discovery : Foundation in Natural Products. Biochem. Pharmacol. 71,1006-1015.
- **SOYCAN-ONEC S., KOC F., COSKUNTUNA L., OZDUVEN ML., GUMUS T. (2015).** The Effect of Oregano and Cinnamon Essential Oils on Fermentation Quality and Aerobic Stability of Field Pea Silages. Asian-Australas J Anim Sci. 28(9): 1281-7.
- **STANILA A., NAGY CS., MARCU A., COZMA., RUSU D. and DAVID L. (2009)** Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B 267419-421.
- **STOHS S. J., & BAGCHI D. (1995).** Oxidative Mechanisms Iin the Toxicity of Metal Ions. Free Radical Biology and Medicine, 18(2). doi: 0891-5849.

T

- **TODOROV.S.D et DICKS.L.M.T. (2005).** *Lactobacillus plantarum* Isolated From Molasses Produces Bacteriocins Active against Gram-Negative Bacteria. Elsevier. Enzyme and Microbiol Technology. 36:318-326.
- **TORTORA G.J., FUNKE B.R. et CASE C.L. (2003).** Introduction à la Microbiologie. Renouveau Pédagogique. Edition du Canada. P945.

V

- **VIGNOLO G. (2000).** Combined Effect of Bacteriocins on the Survival of Various *Listeria* Species in Broth and Meat System. *Curr. Microbiol.*, 41, 410-416.

W

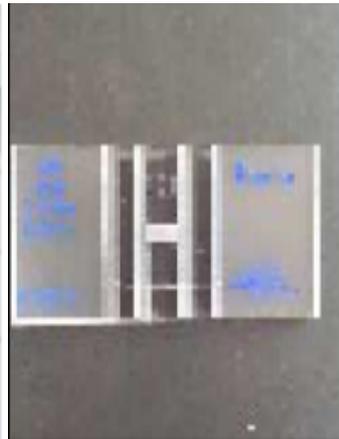
- **WALTON P.H . (1998).** Beginning Group Theory for Chemistry, Workbooks in Chemistry, Oxford University Press, Oxford.
- **WEINMAN S. et MEHUL P. (2000).** Biochimie, Dunod, Paris, p.2-13.
- **World Health Organization. (2007).** The World Health Report 2007. A safer future: Global Public Health Security in the 21 st Century. Geneva, Switzerland: World Health Organization.

Z

- **ZHIRI A. (2006):** Les Huiles Essentielles, Un Pouvoir Antimicrobien Avéré. Art., Nutra News. P16.



Dispositif de synthèse des complexes chimiques Préparation des complexes chimiques



Cellule de Thoma.

Microscope optique



Préparation des suspensions bactériennes

Annexe 1 : Composition des milieux de culture utilisés (g /l).

Le milieu TSA est utilisé pour la conservation des souches bactériennes purifiées. La Gélose Mueller Hinton (MH) est utilisée pour la pré-culture des souches bactériennes, la mise en évidence de l'activité antibactérienne des différents agents antimicrobiens testés, la détermination de la CMI et la CMB ainsi que pour la réalisation des différentes combinaisons.

L'eau physiologique est utilisée pour réaliser les suspensions microbiennes.

➤ Gélose Trypto Caséine Soja Agar

Hydrolysats enzymatique de caséine	15g
Peptone de soja	5g
Chlorure de sodium	7g
Agar	15g
Eau distillée	1000ml

Stérilisation à 120°C pendant 15 mn.

➤ Gélose Mueller Hinton

Extrait de viande	3g
Hydrolysats acide de caséine	17,5g
Agar	18g
Eau distillée	1000ml

pH=7,4

Stérilisation à 120°C pendant 15 mn.

Annexe 2 : La coloration de Gram.

La coloration de Gram, réalisée selon la méthode décrite par DELARRAS (2007) :

- * Préparer un frottis de la souche test ;
- * Coloration primaire : Couvrir la lame de violet de gentiane, et laisser agir pendant 1 minute. Les cellules bactériennes se colorent en violet ;
- * Mordançage : Plonger la lame dans une solution de lugol pendant 1 minute pour fixer le colorant ;
- * Décoloration : Effectuer une décoloration à l'alcool éthylique, laisser agir 30 secondes. Le but de cette opération est de décolorer les bactéries à GRAM- dont la paroi est riche en lipides qui se dissolvent dans l'alcool (solvant organique).
- * Rincer à l'eau distillée afin de ne pas décolorer les GRAM+.
- * Coloration secondaire : Effectuer une contre-coloration à la fuchsine pendant 1 minute. Les GRAM- qui ont été décolorées sous l'effet de l'alcool se recolorent en rose. Ainsi, il sera possible de différencier les deux groupes bactériens ;
- * Rincer la lame à l'eau distillée stérile ;
- * Egoutter et sécher au dessus du bec bunsen
- * Observer à l'objectif x100 à l'immersion.

Résumé

La recherche de nouvelles molécules bioactives susceptibles d'être utilisées comme agents antimicrobiens suscite actuellement, un intérêt tout particulier. Les complexes chimiques possèdent d'importantes activités antimicrobiennes et peuvent se substituer avec succès aux antibiotiques qui montrent leurs inefficacités à l'encontre des microorganismes résistants. Par conséquent, nous avons jugé nécessaire d'évaluer l'activité antimicrobienne des complexes chimiques, produits au laboratoire, sur des souches impliquées dans la pathologie humaine. La méthode de puits, sur milieu gélosé Muller Hinton, a été utilisée pour le test de sensibilité, la détermination de la CMI et de la CMB. Les différents tests ont été effectués sur trois souches isolées de patients malades et trois souches de référence. Les complexes chimiques à base de cobalt (C4, C5, C6) ont montré une haute activité inhibitrice sur toutes les souches bactériennes avec une inhibition prononcée chez *S. aureus* et *P.aeruginosa*. Les plus faibles valeurs de CMI ont été enregistrées avec les complexes chimiques à base de cobalt, C5 et C6, vis-à-vis d '*E. coli*, *P. aeruginosa* et *S. aureus*, soit de 12,5%. Le complexe à base de cobalt C6 a exercé aussi, un effet bactéricide sur toutes les souches qui lui sont sensibles. Afin de déterminer d'éventuelles interactions positives renforçant le pouvoir antibactérien des substances testées, nous avons procédé à des combinaisons à deux entre les substances, ceci à fin de révéler des interactions positives renforçant leur pouvoir antibactérien en réduisant leur CMI.

Mots clefs : activité antibactérienne, CMI, CMB, combinaisons, complexes chimiques

Abstract

Abstract

The search for new bioactive molecules capable of being used as antimicrobial agents arouses currently a particular interest. Chemicals complexes have significant antimicrobial activities and can successfully replace antibiotics that show their inefficiencies against resistant microorganisms, which has led us to evaluate the antimicrobial activity of chemical complexes. The purpose of this study is to evaluate the antibacterial activity of various chemical complexes produced in the laboratory on strains involved in human pathology. The well method on Muller Hinton agar medium was used for the sensitivity test and the determination of CMI and CMB. The different tests were carried out on three isolated strains of patients and three reference strains. Chemical complexes based on cobalt (C4, C5, C6) showed a high inhibitory activity on all bacterial strains with marked inhibition in *S. aureus* and *P. aeruginosa*. The lowest CMI values were recorded with the Cobalt, C5 and C6 chemical complexes, with respect to *E. coli*, *P. aeruginosa* and *S. aureus*, or 12.5%. While the bactericidal effect was greatest, it was obtained with the complex cobalt C6 on all the strains that are sensitive to it. In combinations between substances have revealed positive interactions enhancing the antibacterial potency of the substances tested by reducing their CMI.

Keywords: antibacterial activity, CMI, CMB, combinations, chemicals complexes

Agzul s tmaziyt

Tineggura-agi, atas i yerran lmendad-nsen yer unadi yef molécules bioactives timaynutin i izemren ad ttusmersent mgal imikruben.

Inuddusen ikimyatiyen, ttharaben atas mgal imikruben yerna zemren ad ttfen amkan n *antibiotiques* acku ur zmiren ara i *microorganismes* iǧehden, d anect-agi i ay-ideggren iwakken ad nektazel tigawin n umgal-imikruben n yinuddusen ikimyatiyen.

Iswi agejdan n tezrawt-a, d aktazal n tigawin n mgal-abaktiri (antibactérienne) n waṭas n yinuddusen ikimyatiyen i yettwaxedmen deg tnaremt yef tussniwin n lehlakat yetthazen imdanen.

D tarrayt n wunnan yef umkan yellan gélosé i yessexdem Muller Hinton iwakken ad ijerreb tamǧdist d usebyen n CMI akked CMB.

Atas n yiram i yettwaxedmen yef tlata (kraǧ) n yimediyaten n yimuḍan yettwæezlen, akked tlata nniḍen d imselyanen (référérence). Inuddusen ikimyatiyen yebnan yef cobalt (C4, C5, C6) sbeynen-d tigawt meqqren deg useḥbes n yizuran n lbaktiri yerna d aseḥbes d wawal yer *S. aureus* akked *P.aeruginosa*.

Deg yinuddusen ikimyatiyen yebnan yef cobalt, C5 akked C6, i d-banen wazalen imecṭaḥ maǧdi sdat n *E. coli*, *P. aeruginosa* akked *S. aureus*, tewweǧ yer 12,5%.

Ma yella d analkam n bactéricide (mneqq-baktiri), amur ameqqran yekka-d seg unuddus yebnan yef cobalt C6, akked wayen iyef d-yettban.

Mi ddukklent kra n tangiwin, ta tettezriri yef ta s wudem yelhan, ttakkent-as lǧehd i uḥareb mgal lbaktiri n tangiwin-nni yettwarmen s usenqes n CMI nsent.

Awalen igejdanen : Tigawin mgal-lbaktiri, CMI, CMB, asdukkel, Inuddusen ikimyatiyen

ملخص

ان البحث عن عناصر جديدة ذات نشاط حيوي قادرة على أن تكون مستعملة كقواعل ضد البكتيريا, أصبح يستقطب اهتماما ذات أهمية خاصة. تحوز المركبات الكيميائية على نشاطات مهمة ضد البكتيريا, حيث يمكنها أن تعوض بنجاح المضادات الحيوية, التي أظهرت عدم فعاليتها في مواجهة الميكروبات العسوية المقاومة.

نتيجة لذلك, ارتئينا ضرورة تقييم النشاط المقاوم للبكتيريا بالمركبات الكيميائية, التي تم اصطناعها في المختبر, على البكتيريا المسببة للأمراض البشرية.

و قد استعملنا منهجية البئر على وسط جيلوزي HM قصد تحديد حساسية البكتيريا اتجاه المركبات الكيميائية, تحديد أدنى تركيز موقف و ادنى تركيز قاتل.

أجريت التجارب المختلفة على ثلاث بكتيريا مرجعية و ثلاث بكتيريا من أشخاص مرضى. المركبات الكيميائية على أساس الكوبالت (C6,C5,C4) أظهرت نشاط موقف عالي على كل البكتيريا بالخصوص *S.aureus* و *P.osainerug* أدنى تركيز موقف سجل مع المركب الكيميائي على أساس الكوبالت (C6,C5) اتجاه *S.aureus*, *P.osainerug* و *E.olic* بتركيز % 5,12.

المركبأما عن الكيميائي (C6) فقد سبب أثرا قاتلا على كل البكتيريا ذات حساسية له.

من أجل أظهر تفاعلات ايجابية محتملة تقوي قدرة عناصر التجربة ضد البكتيريا, قمنا بعملية ازدواج بين العناصر, هذا من أجل ابراز التفاعلات الايجابية و تخفيض نسبة أدنى تركيز موقف.