

UNIVERSITE KASDI MERBAH OUARGLA

Faculté des Sciences Appliquées
Département de Génie des Procédés



Mémoire

MASTER ACADEMIQUE

Domaine Sciences et Techniques

Filière : Génie des Procédés

Spécialité : Analyse et Contrôle de Qualité

Thème :

Activité biologique des diazépines synthétisés du phosphore florique

Présenté et soutenu publiquement par :

GHOULI Abdelhamid

SENOUSSI Abdallah

Le : 06 / 06 / 2015

Devant le jury composé de :

M ^{me} : KATEB Lamia	M.A. (A)	Président	UKMO
M ^{me} : GHEDAMSI Rébha	M.A. (A)	Examinatrice	UKMO
M ^{elle} : HACINI Zineb	M.A. (A)	Encadreur	UKMO

ANNEE UNIVERSITAIRE : 2014/2015



REMERCIEMENTS

Je remercie Dieu tout puissant qui m'a donné la force d'achever Ce modeste travail, Je tiens à remercier M^{elle} HACINI ZINEB qui ma fait l'honneur d'avoir veillé et dirigé ce travail, ses conseils pertinents m'ont permis de mener à terme ce travail.

Je remercie également mes parents pour leur soutien, Mon frère et mes sœurs, mes amis, tous mes enseignants du département de Génie des Procédés, ainsi que tous ceux qui m'ont aimé, aidé et autant soutenu de loin ou de près.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

À mes parents pour leur amour et leur soutien

À mes frères et amis pour leurs encouragements

À tous ceux qui m'ont aidé et sont très tôt partis

GHOULI ABDELHAMID

Dédicaces

Je dédie Ce modeste travail à:

A mes parents, ceux à qui je dois tout.

A mes frères et mes sœurs, que ce travail soit pour eux un exemple de
persévérance dans la vie.

A mes beaux parent's qui m'ont été d'un soutien extraordinaire.

A mes Amis (es) et mes camarades de la promotion (Analyse et Contrôle Qualité).

SENOUSSI Abdallah

Table des matières

Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	

Introduction générale.....	1
----------------------------	---

Première partie: Synthèse bibliographique

Chapitre I: Généralités sur les antibiotiques

I. Introduction	3
I.1. Historique	3
I.2. Définition	4
I.3. Les types des antibiotiques	5
I.3.1. Les antibiotiques qui tuent les bactéries on appelle (" Bacteriocidal ")	5
I.3.2. Les antibiotiques qui inhibent l'action des bactéries on appelle ("Bacteriosttic")	5
I.4. Le mode d'action des antibiotiques	6
I.4.1. Antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi bactérienne	6
I.4.2. Antibiotiques agissant au niveau de la membrane cytoplasmique	6
I.4.3. Antibiotiques inhibiteurs du métabolisme des acides nucléiques	7
I.4.4. Antibiotiques inhibiteurs de la synthèse protéique	8
I.4.5. Antibiotiques agissant par inhibition compétitive (antimétabolites)	9
II.1. Classification des antibiotiques	10
II.1.1. En fonction de leur origine	10
II.1.2. En fonction de leur spectre d'activité	11
II.1.3. En fonction de leur mode d'action	11
II.1.4. En fonction de leur nature chimique	12
II.2. Paramètres d'activité	12
II.3. conclusion	13

Chapitre II: Généralités sur les bactéries

I.1. Introduction.....	15
I.2. Historique	15
I.3. Définition	15
I.4. la structure des bactéries	16
I.5. classification des bactéries	17
I.6. Aspect de quelques bactéries pathogènes	19
I.7. La résistance des bactéries	19
I.7.1. Les résistances naturelles	19
I.7.2. Les résistances acquises	20
I.8. Conclusion	21

Chapitre III: Généralités sur les diazépines

I.1. Introduction.....	24
I.2. Définition.....	24
I.3. Synthèse les diazépines.....	25
I.4. Benzodiazépines.....	25
I.5. Caractéristiques et affiliation des benzodiazépines et les diazépines.....	26
I.6. Classification.....	27
I.7. Utilisation des diazépines.....	27
I.8. Conclusion.....	28

Deuxième partie: Etude expérimentale

Chapitre IV: Matériels et méthodes

I. Introduction.....	29
II. Synthèse de leurs diazépines correspondantes.....	30
II.1. Synthèse de Les diazépines (A).....	30
II.2. Synthèse de Les diazépines (B).....	32
II. Activité Biologique.....	33
II.1. Matériel et méthode du test biologique.....	33

II.1.1. Matériel.....	33
II.1.1.1. Provenance des souches bactériennes.....	33
II.1.1.2 Principales caractéristiques des souches bactériennes testées.....	33
II.1.1.3 Matériel chimique.....	37
II.1.1.4 Milieux pour les cultures bactériennes.....	37
II.1.2. Méthodes	38
II.1.2.1. Préparation des solutions	38
II.1.2.2. Préparation des disques	38
II.1.2.3. Préparation des milieux d'ensemencement	39
II.1.2.4. Préparation de la culture bactérien	39
II.1.2.5. Culture et Incubation	39
II.1.2.6. Expression des résultats	39

Chapitre V: Résultats et discussion

I.1. La méthode de l'Antibiogramme.....	42
I.2. Résultats des tests bactériologiques.....	42
I.3. Résultats des la détermination des diamètres d'inhibition de chaque souche.....	42
I.3.1. Les diamètres d'inhibition d'Escherichia coli.....	43
I.3.2. Les diamètres d'inhibition (Pseudomonas Aeruginosa).....	46
I.3.3. Les diamètres d'inhibition (Staphylococcus aureus)	48

Conclusion générale

Bibliographie

Annexes

Liste des figures

Figure 1: Structure générale des pénicillines.....	5
Figure 2: Structure générale des chloramphénicols.....	5
Figure 3: Structure de l'ADN gyrase complexée à l'ADN et à la ciprofloxacine (vert), un antibiotique de la famille des quinolones.....	8
Figure 4: Structure de la petite sous-unité du ribosome bactérien complexée avec la streptomycine (sphères mauves, au centre).....	9
Figure 5: site et mécanisme d'action des antibiotiques sur la structure bactérienne.....	10
Figure 6: Principaux modes d'action.....	11
Figure 7: Formule chimique des tétracyclines.....	12
Figure 8: Schéma de la cellule bactérienne typique.....	16
Figure 9: Évaluation de l'efficacité des antibiotiques.....	21
Figure 10: La forme chimique des différents types de les diazépines.....	25
Figure 11: La structure principale des benzodiazépines.....	26
Figure 12: Synthèse de diazépine (A).....	30
Figure 13: Le composé d'origine du diazépines (A).....	31
Figure 14: Le composé d'origine du diazépines (B).....	32
Figure 15: Aspect microscopique d'Escherichia coli.....	34
Figure 16: Aspect microscopique de Pseudomonas aeruginosa.....	35
Figure 17: Aspect microscopique de Staphylococcus aureus.....	36
Figure 18: Ensemencement des boîtes de pétri.....	37
Figure 19: Etapes du test d'activité antibactérienne.....	40
Figure 20: Inhibition de la croissance d'Escherichia coli en présence des diazépines (A) et (B).....	44
Figure 21: Inhibition de la croissance d'Escherichia coli en présence des diazépines (A) et (B).....	44
Figure 22: Inhibition de la croissance (Pseudomonas Aeruginosa) en présence de les diazépines (A et B).....	47
Figure 23: Inhibition de la croissance (Pseudomonas Aeruginosa) en présence des diazépines (A et B).....	47
Figure 24: Inhibition de la croissance (Staphylococcus aureus) en présence des diazépines (A et B).....	49

Liste des tableaux

Tableau 1: Caractéristiques des bactéries utilisées.....	36
Tableau 2: Préparation des solutions.....	38
Tableau 3: Diamètres (Φ) des zones d'inhibition d'Escherichia coli, après 24h d'incubation à 37°C.....	43
Tableau 4: Diamètres (Φ) des zones d'inhibition (Pseudomonas Aeruginosa), après 24h d'incubation à 37°C.....	46
Tableau 5: Diamètres (Φ) des zones d'inhibition (Staphylococcus aureus), après 24h d'incubation à 37°C.....	48

Liste des Abréviation

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

CMI : La concentration minimale d'antibiotique

CMB : La concentration minimale bactericide

GN: Gélose nutritive

CCM : Chromatographie sur couche mince

Rf : Rapport frontal

IR : Infra-rouge

C ° : Degré Celsius

GABA: Acide gamma-amino butyrique

Ppm : Partie par million

Introduction

Générale

Introduction Générale

L'activité biologique d'un produit chimique, ou l'action d'un antibiotique, c'est la réaction des microorganismes (microbes), résistance ou sensibilité vers ce produit, il existe plusieurs méthodes pour la mise en évidence de l'action d'un antibiotique connues sous le nom d'antibiogramme, la méthode la plus utilisée, dans les hôpitaux pour diagnostiquer les maladies infectieuses, est la méthode de diffusion qui se passe dans un milieu comme le milieu Müller Hinton (préparé en 1941 par Müller Hinton pour caractériser la sensibilité ou la résistance de quelques pathogènes envers des antibiotiques.

L'objectif de cette étude est de connaître le taux de sensibilité de la bactérie et de prévoir la concentration minimale de produit chimique synthétisé cet antibiotique connu sous le nom CMI [1].

L'analyse se fait en suivant les étapes :

- ✓ Préparation du milieu de culture
- ✓ Préparation de la souche Bactérienne
- ✓ Culture et ensemencement
- ✓ La mesure des diamètres d'inhibition

La sensibilité des bactéries ou autre microorganisme est déterminée en mesurant le diamètre d'inhibition de la progression (avancement) bactérienne autour des disques déposés dans les boîtes de pétri [1,2], les microbes sont des microorganismes vivants (Champignons, Bactéries, virus,...), ils existent dans notre entourage.

Dans ce travail nous nous sommes intéressés à synthétiser des diazépines, puis à étudier l'activité biologique avec plusieurs types de bactéries qui ont été obtenus à partir de laboratoire d'analyses médicales de la pharmacie du Mr. Bachir Abid à el Oued.

Ce travail est divisé en deux parties, la partie théorique; on trouve dans le premier chapitre des généralités sur les antibiotiques et dans le 2^{ème} chapitre; généralités sur les bactéries et dans le troisième chapitre on discute l'importance médicale des diazépines, la partie expérimentale contient le chapitre matériel et méthode, et le chapitre résultats et discussion et enfin une conclusion générale.

Partie I

Synthèse bibliographique

Chapitre I

Généralités sur les antibiotiques

I. Introduction :

Les antibiotiques sont des substances chimiques exerçant une action spécifique sur les bactéries, la première molécule antibiotique découverte fut la pénicilline par le biologiste écossais sir ALEXANDER FLEMING en 1928, mais quelle est l'évolution de leur utilisation au cours du temps.

Nous allons tout d'abord observer les débuts de l'utilisation des antibiotiques puis le moyen de choisir ces derniers, suivi d'une expérience à partir de laquelle nous allons déduire les effets et les modes d'actions des antibiotiques grâce auxquels nous trouverons une classification de ceux-ci, et finalement nous parlerons de la résistance aux antibiotiques, des voies d'administration et de la synthèse des antibiotique

I.1. Historique :

En 1889, Paul Vuillemin introduit le terme "antibiose" pour décrire le principe actif d'un organisme vivant qui détruit la vie des autres pour protéger sa propre vie. en 1897, ernest duchesne envisagea de faire une activité de moisissures à des fins thérapeutiques, mais son idée ne se mettra en place qu'au XX ème siècle à la suite de la découverte de Sir Alexander Fleming.

En 1929, il remarque qu'une de ses cultures de staphylocoques est en partie décimée : les bactéries ont été contaminées par la moisissure penicillum notatum, il constate aussi qu'elles ne se développent plus là où la moisissure prolifère.

Il formule alors l'hypothèse que cette-dernière synthétise une substance, la pénicilline, qui bloque le développement de la bactérie, il essaye alors d'extraire le principe actif des moisissures, mais toutes ses tentatives se soldent par des échecs.

Dix ans plus tard, le biochimiste américain rené dubos isole le premier antibiotique : la gramicidine, celle-ci, produite par des bactéries du sol, tue les pneumocoques, pourtant, ce premier antibiotique reste extrêmement difficile à purifier et hautement toxique.

En 1940, deux hommes cultivent une souche de penicillium et parviennent à isoler et à purifier un peu de pénicilline G, après les premiers essais chez des souris infectées où le résultat a été

concluant, on administre cette substance à un policier atteint d'une septicémie, l'état du malade s'améliore, mais le stock de pénicilline étant insuffisant, le traitement doit être suspendu, le policier décède donc, faute de quantité suffisante d'antibiotique.

Pourtant, le premier antibiotique synthétisé a été créé par Gerhard Domagk, un biochimiste allemand, en 1932, il a découvert qu'un colorant, le sulfamidochrysoïdine avait un effet sur les streptocoques, il l'a alors tout de suite breveté sous le nom de prontosil, il a d'ailleurs reçu le Prix Nobel pour sa découverte en 1939, en découvrant l'hémisynthèse, il a ouvert la voie à la antibiothérapie moderne [3].

I.2. Définition :

Un antibiotique (du grec anti : « contre », et bios : « la vie ») est une molécule naturelle ou synthétique qui détruit ou bloque la croissance des bactéries [4].

De manière simplifiée un antibiotique est, dans le domaine médical, « une substance chimique organique d'origine naturelle ou synthétique inhibant ou tuant les bactéries pathogènes à faible concentration et possédant une toxicité sélective », par toxicité sélective, on entend que celle-ci est spécifique des bactéries et que la molécule antibiotique n'affecte pas l'hôte infecté, au moins aux doses utilisées pour le traitement.

Plus généralement, pour les microbiologistes et les chimistes, un antibiotique est une substance anti-bactérienne [5], il a existé des variantes dans cette définition qui diffèrent par la présence ou non des concepts de toxicité sélective, d'origine microbienne et de limitation de cible aux seules bactéries.

Les antiseptiques ne sont pas des antibiotiques, leur fonction est de tuer un maximum de germes (bactéries, champignons, virus), leur mode d'action n'est pas spécifique, ils ne s'utilisent que localement en application externe et mal employés (trop concentrés par exemple) ils peuvent provoquer des lésions et/ou retarder la cicatrisation, les antibiotiques ne sont pas actifs contre les virus. Un produit luttant contre les virus est un antiviral.

I.4. Le mode d'action des antibiotiques:

Le principe d'action des antibiotiques consiste à bloquer sélectivement une étape d'un mécanisme essentiel à la survie ou à la multiplication des micro-organismes, le mécanisme ciblé par l'antibiotique est le plus souvent spécifique des bactéries et n'a pas d'équivalent chez les eucaryotes et en particulier chez l'homme, ainsi idéalement l'antibiotique tue ou bloque la multiplication des bactéries mais n'a pas d'impact sur les cellules du patient traité [8].

Il existe ainsi quelques grandes familles de mécanisme d'action pour les antibiotiques, ce qui permet de les regrouper en grandes classes décrites ci-après.

I.4.1. Antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi bactérienne:

Certaines bactéries sont protégées de l'environnement extérieur par une paroi, qui doit croître quand la bactérie se divise, cette paroi contient en particulier une couche de peptidoglycane plus ou moins épaisse, un polymère spécifique comportant des acides aminés et des sucres, il existe une machinerie de synthèse qui fabrique, les composants de cette paroi et qui est composée d'enzymes et de systèmes de transport acheminant les composants à la surface cellulaire.

La catégorie des antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi bactérienne comprend entre autres :

- ✓ la bacitracine
- ✓ les pénicillines : amoxicilline
- ✓ les céphalosporines
- ✓ les glycopeptides comme la vancomycine

I.4.2. Antibiotiques agissant au niveau de la membrane cytoplasmique:

L'existence d'une membrane plasmique intacte est nécessaire à la survie bactérienne, son rôle est double, d'une part elle permet de séquestrer métabolites et ions nécessaires à l'intérieur du cytoplasme, d'autre part, elle permet de maintenir un gradient de protons entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule, généré par la chaîne respiratoire et le cycle de Krebs et qui permet le stockage de l'énergie cellulaire.

Il existe un certain nombre de molécules antibiotiques qui agissent sur la membrane des cellules, soit en agissant comme des détergents qui désorganisent les lipides, soit en formant un pore (un trou) dans la membrane qui va permettre la fuite des composés cellulaires.

- Parmi ces composés attaquant la membrane des cellules bactériennes, on trouve :

 la polymyxine qui est un surfactant (détergent) interagissant avec les lipides membranaires et qui désorganise la bicouche phospholipidique membranaire, ceci détruit l'intégrité de la membrane, les éléments hydrosolubles sortent de la cellule, cette molécule est efficace sur les cellules en croissance et au repos.

 la gramicidine, un peptide qui s'insère dans la membrane en formant un pore cylindrique permettant la fuite des cations [8,9].

I.4.3. Antibiotiques inhibiteurs du métabolisme des acides nucléiques :

La synthèse des acides nucléiques, ADN et ARN est absolument vitale pour les cellules, sans elle, la division cellulaire et la fabrication des protéines est impossible, un certain nombre de composés peuvent bloquer de manière directe ou indirecte ces voies de biosynthèse des acides nucléiques et ont en conséquence une activité antibiotique.

Chez les bactéries, le ou les chromosomes sont souvent circulaires et se trouvent dans un état topologique particulier caractérisé par un surenroulement négatif, ce surenroulement négatif est essentiel à la réplication de l'ADN (et aussi à la transcription de l'ARN) et constitue une caractéristique de l'ADN bactérien, c'est l'ADN gyrase qui introduit ce surenroulement négatif dans l'ADN.

Cette enzyme, de la famille des topoisomérases est essentielle à la survie des bactéries, mais n'a pas d'équivalent chez les eucaryotes, il existe enfin des inhibiteurs spécifiques de l'ARN polymérase bactérienne qui bloquent la transcription des gènes et la synthèse des ARN messagers, parmi ces antibiotiques, on trouve en particulier la rifampicine qui est aujourd'hui utilisée en association à d'autres antibiotiques pour le traitement de la tuberculose.

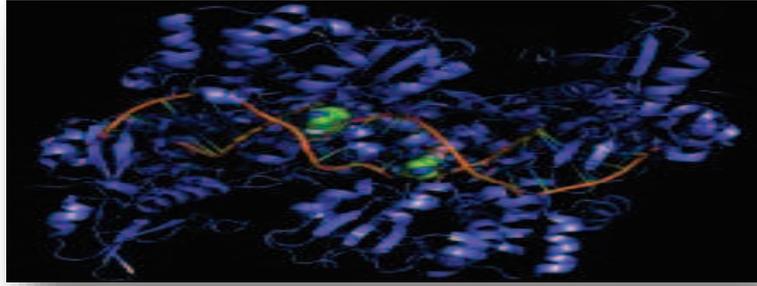


Figure 3 : Structure de l'ADN gyrase complexée à l'ADN et à la ciprofloxacine (vert), un antibiotique de la famille des quinolones

I.4.4. Antibiotiques inhibiteurs de la synthèse protéique:

La synthèse des protéines est un processus essentiel des cellules vivantes, l'acteur central de ce processus dans lequel l'ARN messager est traduit en protéine est le ribosome, l'organe cellulaire qui est responsable de cette étape, les détails du mécanisme de traduction et les ribosomes des bactéries sont sensiblement différents de ceux des eucaryotes, il existe un grand nombre de molécules antibiotiques qui exploitent ces différences et sont capables de bloquer sélectivement la traduction des protéines chez les bactéries, mais pas chez l'homme ou l'animal.

De fait, approximativement la moitié des antibiotiques utilisés en thérapeutique (disposant de l'AMM) ont pour cible le ribosome bactérien, ces antibiotiques se répartissent en plusieurs classes, de nature chimique et de mode d'action différents, la plupart interagissent avec l'ARN ribosomique, enfin certains antibiotiques bloquent la traduction en inhibant l'action des facteurs de traduction associés au ribosome

✚ Les aminoglycosides ou aminosides (exemples: streptomycine, gentamicine, amikacine) se fixent sur la petite sous-unité des ribosomes (30 Svedberg) au niveau du site du décodage des codons, empêchent la traduction de l'ARNm et conduisent à des erreurs de lecture.

✚ Les phénicolés (exemples: chloramphénicol, thiamphénicol) bloquent la formation de la liaison peptidique, ILS se fixent sur la grande sous-unité du ribosome bactérien (50 Svedberg) mais pas sur Celle des ribosomes eucaryotes.

✚ Les cyclines (exemples: tétracycline, doxycycline, auréomycine): en se fixant sur la sous-unité (30 S), elles bloquent l'élongation de la chaîne polypeptidique [9].

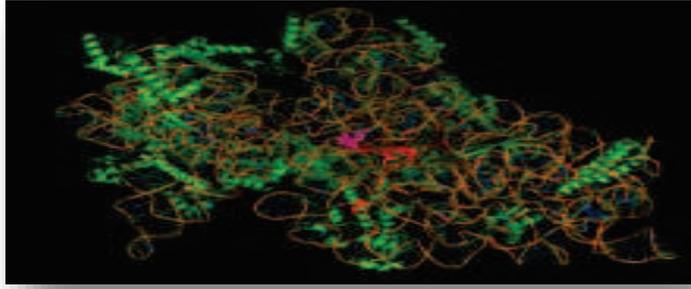


Figure 4 : Structure de la petite sous-unité du ribosome bactérien complexée avec la streptomycine (sphères mauves, au centre)

I.4.5. Antibiotiques agissant par inhibition compétitive (antimétabolites):

Une autre classe importante d'antibiotiques interfère avec la production de métabolites essentiels, bloquant la synthèse de différents constituants essentiels de la cellule: lipides acides amines nucléotides.

Une voie particulièrement importante qui est fréquemment ciblée est celle de la synthèse des folates (vitamin B9), ses dérivés notamment le dihydrofolate et le tétrahydrofolate, interviennent dans des réactions de transfert de groupements à un atome de carbone (méthyle, formyle) et en particulier dans des réactions de méthylation [9].

Ces réactions sont essentielles à la synthèse de la thymine et par voie de conséquence, celle de l'AND, ces transferts de carbone dépendant du folate interviennent également de façon centrale dans le métabolisme de certains acides aminés : méthionine, glycine, sérine et donc indirectement dans la synthèse des protéines [8,9].

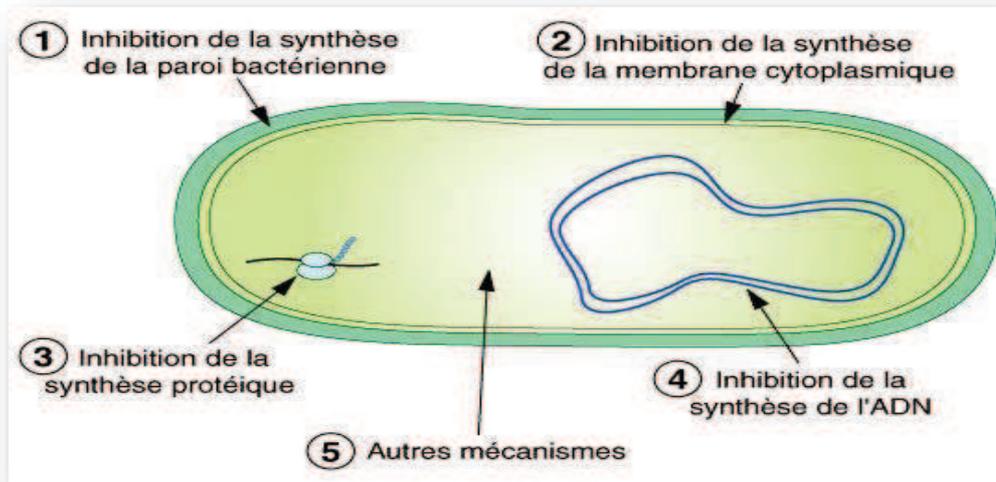


Figure 5 : site et mécanisme d'action des antibiotiques sur la structure bactérienne

II.1. Classification des antibiotiques:

Il existe de nombreux antibiotiques, qui peuvent être classés en familles selon leurs modes d'action ou leur structure moléculaire [10]:

II.1.1. En fonction de leur origine :

Élaboré par un organisme (naturel) ou produit par synthèse (synthétique ou semi-synthétique)

➤ Les antibiotiques naturels ou produits par les micro-organismes :

Champignons (Pénicilline, Céphalosporine) ou bactéries (Streptomycine, Chloramphénicol, Polypeptides).

➤ Les antibiotiques synthétique ou produits obtenus entièrement par voie chimique : Sulfamide, Acides nalidixiques.

➤ Les antibiotiques semi-synthétique :

Ces antibiotiques sont obtenus à partir d'une fraction moléculaire naturelle sur laquelle a été greffé un radical chimique.

II.1.2. En fonction de leur spectre d'activité :

- **Large spectre:** Actif sur la majorité des bactéries Gram positif ou négatif
- **Spectre limité :** Actif sur les bactéries Gram positif et quelques Gram négatif.
- **Spectre étroit :** Actif uniquement sur certains Gram positif ou sur certains Gram négatif.

II.1.3. En fonction de leur mode d'action :

L'activité thérapeutique se manifeste à très faible dose d'une manière spécifique, par l'inhibition de certains processus vitaux, à l'égard des virus, des microorganismes ou même de certains êtres

Leur mode d'action bien que parfois imparfaitement connu, est d'une grande variabilité, voire complexité, sa connaissance peut permettre de comprendre la synergie et les mécanismes de résistance naturelle et acquise.



Figure 6 : Principaux modes d'action

II.1.4. En fonction de leur nature chimique :

Très variable, elle est basée souvent sur une structure de base (ex: cycle bêta-lactame) sur laquelle il y a ensuite une synthèse.

La classification selon la nature chimique permet de classer les antibiotiques en famille (bêta-lactamines, aminosides, tétracyclines,...etc), nous adopterons cette classification, qui est la plus utilisée, dans notre étude.

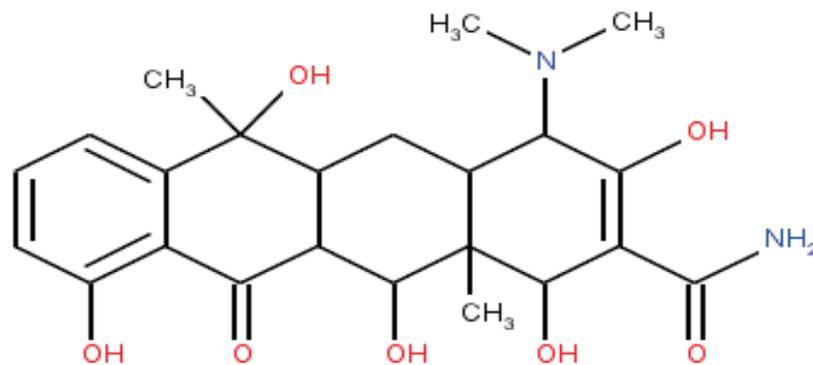


Figure 7 : Formule chimique des tétracyclines

II.2. Paramètres d'activité :

L'analyse de l'activité d'un antibiotique donné sur une bactérie a conduit à définir un certain nombre de paramètres qualitatifs et quantitatifs, pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition en mm et en déduit la sensibilité ou la résistance.

- On définit de deux concentrations critiques d'antibiotique:

CMI : La concentration minimale d'antibiotique permettant d'inhiber (bactériostase) totalement la multiplication bactérienne, après 18 à 24 heures de contact à 37 °C. Ceci se décline en plusieurs variantes:

✚ La CMI₅₀ est la plus faible concentration inhibant, en 18 à 24 heures, la multiplication de 50 % des bactéries

✚ La CMI₉₀ est la plus faible concentration inhibant, en 18 à 24 heures, la multiplication de 90 % des bactéries.

CMB : La concentration minimale bactéricide, qui est la plus faible concentration permettant de détruire ou de tuer (bactéricidie) 99,99 % des bactéries après 18 à 24 heures de contact avec l'antibiotique.

L'analyse de la concentration minimale bactéricide et de la concentration minimale inhibitrice (CMB/CMI) permet de caractériser l'effet de l'antibiotique étudié sur une souche bactérienne donnée :

- ⇒ Lorsque le rapport $CMB / CMI = 1$, l'antibiotique est dit « bactéricide absolu ».
- ⇒ S'il est proche de 1, l'antibiotique est dit « bactéricide ».
- ⇒ S'il est supérieur à 2, l'antibiotique est dit simplement « bactériostatique » [11].

II.3. Conclusion :

En rappelant que notre but était de comprendre comment les antibiotiques agissent sur les bactéries, nous pouvons conclure qu'il existe deux types d'antibiotiques : les antibiotiques bactériostatiques et les antibiotiques bactéricides.

- ✓ L'un agit sur les bactéries en inhibant la croissance et la reproduction des bactéries.
- ✓ L'autre agit sur les bactéries en détruisant différentes parties de la cellule telles que, la paroi cellulaire, l'ADN, la synthèse des protéines ou encore la membrane cytoplasmique, ceci se passe lorsque la dose d'antibiotiques est normale.

Chapitre II

Généralités sur les bactéries

I.1. Introduction :

Si les bactéries existent depuis plus de 4 milliards d'années, la découverte de leur existence date de seulement quelques siècles, avec notamment les expériences de Louis Pasteur et Robert Koch, ainsi, on a pu identifier des bactéries pathogènes, et inventer de nombreux remèdes, l'importance de l'hygiène, la stérilisation, l'asepsie, l'antisepsie, et les antibiotiques permettent des progrès considérables dans le domaine médical, en effet, de nombreuses infections, blessures, et maladies jusqu'à lors mortelles ont pu être maîtrisées, de plus, l'utilisation des bactéries est essentielle pour la croissance humaine, ainsi, les biotechnologies et les probiotiques sont bénéfiques à l'homme.

I.2. Historique :

Les bactéries sont des organismes minuscules que l'on trouve à peu près partout, elles manifestent parfois leur présence dans les blessures, elles s'infectent ; le lait surit, la viande, mais habituellement nous les ignorons parce que leurs activités sont moins évidentes et à cause de leur petite taille.

En 1673, Antoni van Leeuwenhoek (1632-1723) fut le premier à observer les bactéries qu'il appela « animalcules », en plus de la première description des globules rouges et des spermatozoïdes, ce drapier hollandais observa pour la première fois les bactéries et décrivit leurs différentes formes.

Ce n'est que deux siècles plus tard que le rôle des bactéries dans les processus de fermentation et dans la transmission des bactéries a été découvert et que leur étude a commencé [12,13].

I.3. Définition :

La bactérie est un micro-organisme ubiquiste, unicellulaire et sans noyau (procaryote) dont le génome est constitué d'ADN, celui-ci consiste en un seul chromosome, et on note éventuellement la présence de plasmides (petit morceau d'ADN circulaire), l'ensemble des bactéries forme le règne des eubactéries (Eubacteria) [14].

Certaines bactéries peuvent être pathogènes, chez l'homme, les symptômes d'une infection bactérienne sont similaires à ceux observés lors d'une infection virale (éruption cutanée, toux, écoulement nasal, larmoiement, fatigue, nausées, fièvre et douleurs musculaires), parfois, elles sont mortelles, les infections bactériennes peuvent être traitées avec des antibiotiques [15].

I.4. la structure des bactéries :

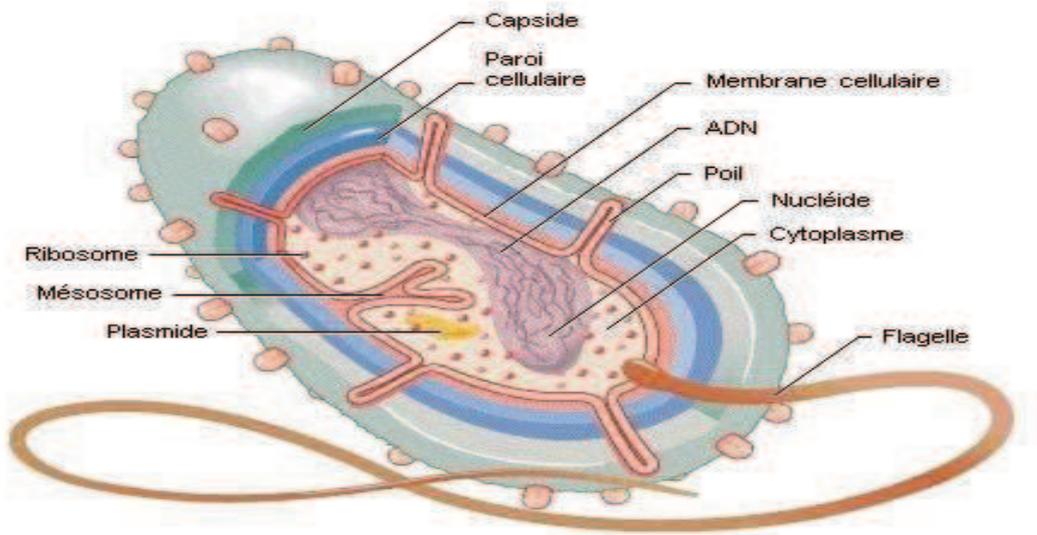


Figure 8 : Schéma de la cellule bactérienne typique

- **D'une façon générale, une bactérie est composée de :**

➤ **Paroi cellulaire :** Une paroi cellulaire est une paroi assez rigide entourant certaines cellules, située à l'extérieur de la membrane cellulaire, qui apporte à la cellule un soutien structurel, une protection, et agit comme un mécanisme de filtrage, la paroi cellulaire fait aussi obstacle à l'expansion lorsque l'eau pénètre dans la cellule.

Les plantes, les bactéries, champignons, les algues, et certaines archées possèdent des parois cellulaires. Les animaux et les protozoaires n'en ont pas [16].

➤ **Membrane plasmique :** La membrane plasmique, ou plasmalemm, est la membrane qui délimite une cellule, elle sépare le cytoplasme du milieu extérieur [17].

- **Cytoplasme** : Le cytoplasme des bactéries contient de nombreux ribosomes et un chromosome fait d'ADN à double brin, en général unique, circulaire [18].
- **Capsule** : Couche supplémentaire à l'extérieure de la paroi composée de polysaccharides
- **Pili** : Le pilus (pili au pluriel) est un terme générique désignant deux types d'appendices de surface des bactéries : les fimbriae et les pili sexuels, également appelés pili de conjugaison, ce sont des structures protéiques constituées de sous-unités peptidiques appelées pilines, attention, les pili sont différents des flagelles, qui sont des structures impliquées dans la mobilité des bactéries [19].

I.5. classification des bactéries :

La classification des bactéries entre elles repose sur plusieurs type's d'observations et d'études, les bactéries peuvent ainsi être classées et donc identifiées en fonction [20]:

- ✚ De leur morphologie microscopique (bactérie de type coque, bacille, vibron; isolés, par deux, en chaînettes...)
- ✚ de leur morphologie macroscopique (taille, forme, couleur... des colonies sur milieux de culture gélosés)
- ✚ De leur mobilité (mobilité ou immobilité à une température donnée)
- ✚ De la présence de spores (à l'état frais ou après coloration)
- ✚ Du résultat de la coloration de Gram (coloration de Gram positive ou négative)
- ✚ De la température de croissance (4° C, 20° C, 30° C, 37° C...)
- ✚ Du type respiratoire (aérobie, anaérobie strict, aéro-anaérobie facultatif, microaérophile...)
- ✚ Des besoins nutritionnels (nécessité de substances particulière pour le développement)
- ✚ De la capacité à utiliser certaines sources de carbone ou d'azote (on parlera de biotypes ou biovars, de zymotypes ou zymovars).

Une donnée importante pour la classification bactérienne est le pourcentage en nucléotides G et C (% G + C) de chaque génome, ainsi, deux espèces bactériennes proches auront des pourcentage en G et C voisins [21].

Les organismes procaryotes (procaryotae) regroupent les organismes unicellulaires ne présentant pas de noyau individualisé, c'est à dire les bactéries et les archaeobactéries, les eucaryotes (eucarya) regroupent quand à eux l'ensemble des organismes unicellulaires ou multicellulaire à noyau individualisé.

Le règne (procaryotae) est le premier niveau de classification, vient ensuite le domaine (bacteria), le phylum, la classe, l'ordre, la famille, le genre, et l'espèce, cette dernière constitue l'unité de classification, toutefois, il est souvent nécessaire de subdiviser une espèce en différentes sous-espèces (subspecies).

▪ **Voici la classification du colibacille bien connu, ou escherichia coli :**

- **règne** : Procaryotae
- **domaine** : Bacteria
- **phylum** : Proteobacteria
- **classe** : Gammaproteobacteria
- **ordre** : Enterobacteriales
- **famille** : Enterobacteriaceae
- **genre** : Escherichia
- **espèce** : Escherichia coli

L'on notera que les noms latins s'écrivent en italique et qu'au niveau de la dénomination d'une espèce, le nom du genre prend une majuscule : escherichia, ce qui n'est pas le cas du nom de l'espèce : coli, on emploie souvent la notation suivante e. coli, ou le nom du genre est représenté par l'initiale [22,23].

I.6. Aspect de quelques bactéries pathogènes :

Certaines espèces de bactéries peuvent provoquer des maladies graves sur la santé humaine, certains types de bactéries pathogènes [24]:

✚ Cocci Gram (+)

- ✓ Staphylocoque doré : amas en “ grappes de raisin ”
- ✓ Pneumocoque : diplocoques (par 2) en “ flammes de bougie ”

✚ Cocci Gram (-)

- ✓ Méningocoque : diplocoques en “ grains de café ”

✚ Bacilles Gram (+)

- ✓ Agent de la diphtérie : amas en “ lettres grecques ” ou palissades

✚ Bacilles Gram (-)

- ✓ Escherichia coli : individus isolés

I.7. la résistance des bactéries :

On classe les antibiotiques par famille, en fonction de leur structure chimique et de leur mode d'action, le spectre d'action d'un antibiotique est différent d'une famille et d'un antibiotique à l'autre et peut également évoluer avec le temps en fonction de l'acquisition de résistances, il existe deux types de résistance des bactéries pour les antibiotiques: **les résistances naturelles et les résistances acquises** [25].

I.7.1. les résistances naturelles :

La résistance naturelle ou intrinsèque est un caractère d'espèce qui touche toutes les bactéries de l'espèce considérée, elle est stable, transmise à la descendance (elle a pour support génétique le chromosome bactérien) mais elle n'est pas ou peu transmissible sur un mode horizontal (d'une bactérie à l'autre au sein d'une même espèce ou entre espèces différentes) [26].

Exemple de résistances naturelles:

1/ *Klebsiella* spp, produit naturellement des bêta-lactamases, cette enzyme est alors présente dans l'espace périplasmique de la bactérie et conduit à la destruction d'antibiotiques comme les pénicillines A, avant que ceux ci ne puissent atteindre leur cible bactérienne.

2/ Les bactéries anaérobies sont naturellement résistantes aux aminosides car le passage des aminosides à travers la membrane cytoplasmique nécessite un système de transport actif absent chez les anaérobies [27].

I.7.2. les résistances acquises :

Il s'agit d'un caractère qui ne concerne alors que quelques (ou parfois de nombreuses) souches d'une espèce donnée, la résistance acquise est moins stable, mais elle se propage souvent de façon importante dans le monde bactérien, la résistance acquise résulte d'une modification du capital génétique de la bactérie, lui permettant de tolérer une concentration d'antibiotique plus élevée que celle qui inhibe les souches sensibles de la même espèce, la résistance acquise a été observée dès le début de l'antibiothérapie mais sa fréquence était initialement faible, la généralisation de l'utilisation des antibiotiques a conduit à une sélection des souches résistantes.

Ce phénomène a atteint une telle ampleur que la seule identification bactérienne ne permet plus de prédire le comportement d'une souche isolée vis-à-vis des antibiotiques d'où l'intérêt et la nécessité de réaliser des antibiogrammes.

- Elle existe deux types de résistance :

✓ **Chromosomique** : L'apparition de la résistance est en général la conséquence d'une mutation qui apparaît sans le chromosome.

✓ **Plasmidique** : Les plasmides naturels en général un certain nombre de gènes et en particulier des gènes de résistance à de antibiotique, ainsi que des gènes de transfert permettant le passage du plasmide d'une bactérie à une autre, ce transfert s'effectue en général par conjugaison [28].

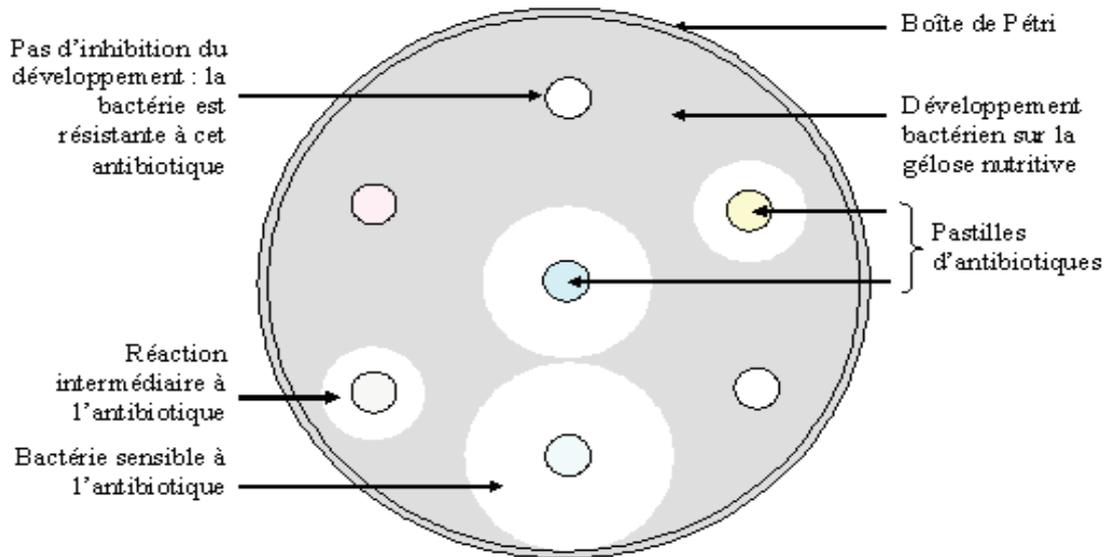


Figure 9 : Évaluation de l'efficacité des antibiotiques

I.8. Conclusion :

Nous avons appris de cette partie de notre travail les composants de bactéries, et comment ils affectent la cellule ou le corps humain et le procédé de la résistance bactérienne aux antibiotiques, et nous avons souligné certains types de bactéries pathogènes.

Par conséquent, nous concluons qu'il existe un type de bactéries bénéfiques pour le corps, et également nocif pour le corps.

Chapitre III

Généralités sur les diazépines

I.1. Introduction :

Composés hétérocycliques sont souvent considérés comme des structures privilégiés dans chimie médicinale en raison de leurs effets biologiques, les diazépines sont une des classes importantes des agents thérapeutiques, par exemple; les diazépines ont différentes anticonvulsivants [29], anti hypnotique et activités anxiolytiques.

I.2. Définition :

- **Étymologie** : grec di- deux fois, α a privatif, zôê vie, ép indiquant que le cycle a sept chaîons, suffixe -ine indiquant l'insaturation maximale [30].

Une diazépine est un composé insaturé hétérocyclique à sept atomes dont deux d'azote, ainsi, selon la position relative de ces hétéroatomes, une diazépine peut être une [31,32] :

 **1,2-diazépine**

 **1,3-diazépine**

 **1,4-diazépine**

Et certains dérivés utilisés diazépine dans le traitement de certaines maladies chroniques, par exemple :

- ✓ L'épilepsie, aussi appelée mal comitial
- ✓ Les gliomes ou tumeurs gliales
- ✓ La sclérose latérale amyotrophique (SLA)
- ✓ Relaxants musculaires.

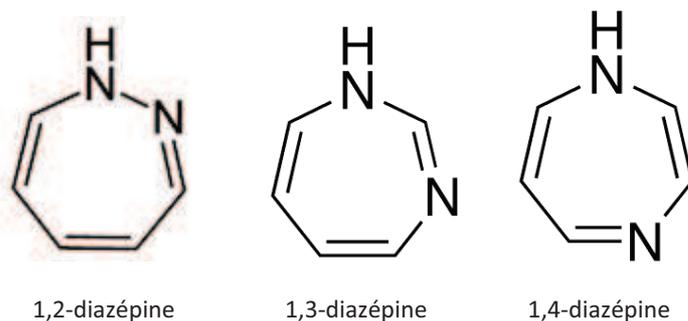
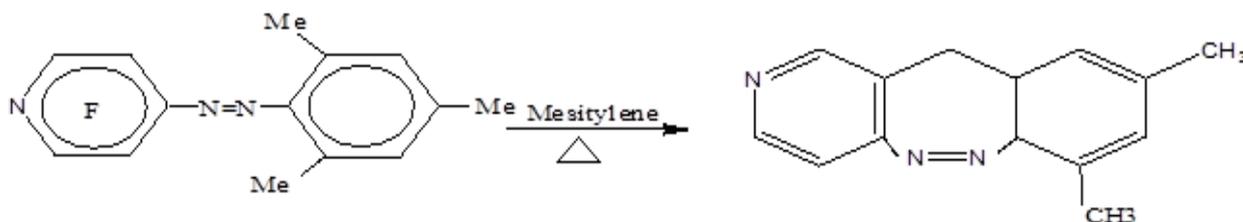


Figure 10 : La forme chimique des différents types de les diazépines

I.3. Synthèse les diazépines :



- La fusion de ce cycle avec un cycle benzénique produit les composés basiques de la famille des benzodiazépines.

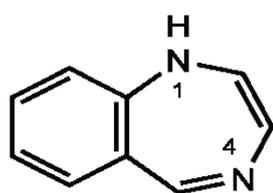
I.4. Benzodiazépines :

Nom de tous les composés formés par l'accolement d'un noyau benzène à un noyau diazépine à 7 atomes dont deux azotes, en fonction de la position des atomes d'azote on répertorie principalement :

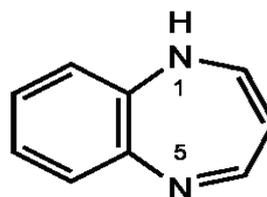
✚ Les benzodiazépines-1,4, les plus courantes dans l'arsenal thérapeutique (Exemple: diazépam, bromazépam, clorazépate dipotassique, flumazénil, alprazolam ce dernier avec un cycle supplémentaire), dans lesquelles un seul azote du cycle azépine est accolé au noyau phényle.

✚ Les benzodiazépines-1,5 (Exemple: clobazam) dans lesquelles les deux atomes d'azote sont accolés au noyau phényle ; on trouve dans cette série de nombreux et puissants agents tranquillisants, anxiolytiques, antiépileptiques, hypnotiques, myorelaxants, voire un antagoniste de ces produits le flumazénil utilisé dans les intoxications par les benzodiazépines et en anesthésiologie pour interrompre les effets de ces dernières [33].

La plupart de ces molécules agissent sur le système GABA ergique, en exerçant un effet agoniste, via des sites spécifiques qui font partie du complexe récepteur GABA-A post-synaptique, facilitant ainsi la fixation du transmetteur et l'ouverture du canal à l'ion chlorure.



benzodiazépine-1,4



benzodiazépine-1,5

Figure 11 : La structure principale des benzodiazépines

I.5. Caractéristiques et affiliation des benzodiazépines et les diazépines :

Médicaments de l'anxiété, de l'hyperémotivité, et des situations de stress, les plus utilisés sont les benzodiazépines qui ont 5 propriétés [34]:

- ✓ Myorelaxantes,
- ✓ Anticonvulsivantes,
- ✓ Action sédatrice à forte dose
- ✓ Anxiolytique,
- ✓ Amnésiante.

Ils appartiennent au groupe des psycholeptiques ou sédatifs psychiques (qui diminuent l'activité mentale).

I.6. Classification :

Les diazépines regroupent la moitié des tranquillisants disponibles, on distingue:

- ✓ Les benzodiazépines (Valium, Tranxene, Temesta ...)
- ✓ Les autres familles :
 - ⇒ Les carbamates (Equanil)
 - ⇒ Les pipérazines (Atarax)
- ✓ Divers (Buspar).

I.7. Utilisation des diazépines :

Une molécule qui n'a pas la structure chimique diazépine peut en avoir les propriétés, agir sur les mêmes récepteurs et être ainsi assimilée, quant à ses effets, à une diazépine.

La plupart des diazépines sont des agonistes qui favorisent l'ouverture du canal Cl⁻ par le GABA et ont donc un effet inhibiteur, elle agissent en augmentant la fréquence d'ouverture du canal, certaines diazépines, non utilisées en thérapeutique, favorisent sa fermeture et sont appelées agonistes inverses, d'autres diazépines peuvent se fixer sur les récepteurs sans les activer et sont antagonistes des précédentes, les recherches actuelles laissent supposer l'existence de médiateurs endogènes ayant des propriétés agonistes, antagonistes ou agonistes inverses des récepteurs aux diazépines [35].

Les diazépines qui favorisent l'ouverture du canal Cl⁻ ont des propriétés pharmacologiques communes : elles sont anxiolytiques, hypnotiques, anticonvulsivantes, myorelaxantes et peuvent avoir un effet amnésiant, par conséquent, elles ont potentiellement les mêmes indications et les mêmes effets indésirables, il existe cependant entre les diverses diazépines des différences :

 **pharmacodynamiques** : certaines molécules ont un effet dominant, par exemple un effet anticonvulsivant relativement plus important que les autres effets, sans que l'on en connaisse précisément l'explication.

 **pharmacocinétiques** : la rapidité et la durée d'action expliquent beaucoup des différences entre molécules et leurs indications préférentielles.

Partie II

Etude Expérimentale

Chapitre IV

Matériels et méthodes

I. Introduction:

Les diazépines et leurs dérivés structuraux constituent une partie importante de la chimie pharmaceutique par leurs nombreuses et diverses propriétés médicinales (Relaxants musculaires, anticonvulsantes, la sclérose latérale amyotrophique (SLA)) et biologiques.

Le but de notre étude est de tester in vitro le pouvoir antibactérien de quelques diazépines obtenues par voie de synthèse sur la croissance de différentes souches microbiennes.

L'objectif de notre travail est d'étudier l'activité biologique de quelques souches bactériennes.

⇒ **Le premier chapitre** du travail expérimental, premièrement la synthèse des diazépines (A) et diazépines (B), les outils et la méthode de travail, on procède aux tests d'activité biologique, qui sont fait sur quelques souches bactériennes (la souche d'Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus).

⇒ **Le deuxième chapitre**, résultats et discussion, nous allons discuter dans cette partie en particulier les résultats définitifs Pour le travail expérimental

II. Synthèse des diazépines correspondantes

II.1. Synthèse des diazépines (A) :

3,5,6- trifluoro-2- phophinomethyl diphenyl-4- (trimethylphenylazo) pyridine 4a (5 g, 10,46 mmol) a été dissous dans du mésitylène (50 ml) dans un ballon à fond rond (100 ml) équipé d'un condenseur à reflux, la solution a été chauffée au reflux et la progression de la réaction a été suivie par de minces - chromatographie sur couche finalement, la solution est devenue brune de 8 heures reflowing, CCM analyse a montré que la majeure partie de la matière de départ rouge avaient été convertis en un produit de couleur jaune, de sorte que le solvant a été éliminé par distillation (évaporateur rotatif, 80 ° C, 1 mm Hg).

Le résidu brun foncé a été soumis à une Chromatographie sur colonne de dry_ fiole [silice (40x 50 mm) l'éther de pétrole (point d'ébullition 40- 60 ° C) - dichlorométhane] pour donner:

- ✓ Composé azoïque qui n'a pas réagi (0,45 g, 0,95 mmol, 9,4% de conversion), identifiée en comparant son CCM Rf, le spectre IR et un point de fusion avec ceux d'un échantillon authentique.
- ✓ Un composant jaune / orange qui a été recristallisé à partir d'éthanol aqueux pour donner des aiguilles jaunes de -orange de 5f.
- ✓ Un 40mg de goudron marron qui a été jeté.

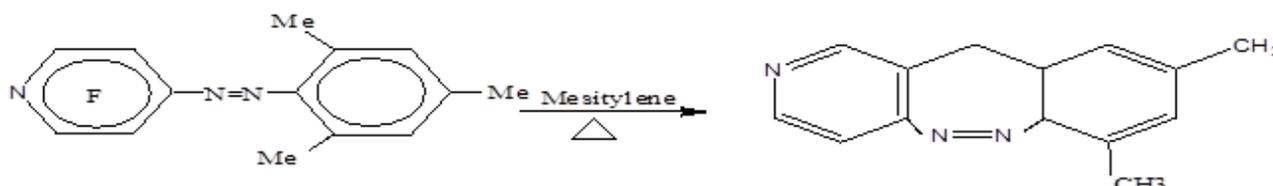


Figure 12 : Synthèse de diazépine (A)

Mp: 212-214 ° C

✓ ν_{max} (KBr disque, cm^{-1}): 2968,2 (CH_2 CH_2 asym.stretch et sym.stretch 2850-2860).
1600 (N = N), 1434,9 (Ar-F), 1174,6 (P = O).

✓ δ_{F} (54,6 MHz, CDCl_3): -80,9 (1F, d, $J = 23.7\text{Hz}$, F-4), -14,2 (1F, d, $J = 23.7\text{Hz}$, F-1)

✓ δ_{H} (300 MHz; CDCl_3): 2,3 (3H, s, 7- CH_3), 2,52 (3H, s, 9- CH_3), 2,76 (1H, dd, $J = 13,7$ Hz HCHPO), 3,0 (1H, ddd, $J = 13,62$ HCHPO), 3,4 (2H, s, H- CH_2), 6,85 (1H, s, H-8), 7,12 (1H, s, 10-H), 7,03 à 7,85 ((10H, m, Ha).

m / z (FAB) 473 (M ++ 1,72.7), 472 (M +, 90), 471 (M + -1,6.2), 444 (4,2%), 443 (5,6%), 429 (7,6%), 396 (41), 272 ($\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{F}_2\text{N}_3$ CH_2 , + 100), 258 (80), 215 (25), 201 (12), 147 (18) 119 (63).

✓ Calculé pour $\text{C}_{27}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{F}_2\text{OP}$: Nécessite C, 68,6%; H, 4,6%; N, 8,8%; F, 8,0%; P, 6,3%; O, 3,7%.

Trouvé C, 68.6% ; H, 4.7% ; N, 8.6% ; F, 8.1% ; P, 6.3% ; O, 3.8%.



Figure 13 : Le composé du diazépines (A)

II.2. Synthèse des diazépines (B) :

Dans une expérience typique, la 3- chloro-2, 5,6- trifluoro-4- (2, 4,6- triméthylphénylazo) pyridine (4,10 g, 8,3 mmol) a été chauffé au reflux dans le mésitylène (60 ml) pendant 7 heures. L'élimination du mésitylène par distillation (évaporateur rotatif, 80 ° C, 1 mm Hg) a révélé une huile brun-jaune qui a été purifiée par Chromatographie dry_ colonne de ballon [de silice (40 x 50 mm) d'éther de pétrole (point d'ébullition 40- 60 ° C) - dans le dichlorométhane] donner:

1) Composé azoïque qui n'a pas réagi (0,36 g, 0,76 mmol, 9,7% de conversion), identifiée en comparant son CCM La valeur de R_f, la valeur IR avec celui d'un échantillon authentique.

2) Une composante jaune / orange qui a été recristallisé de l'éther de PET de forme (80 à 100 °C) pour donner des aiguilles orange jaunes d'analyse de 5f HPLC.

- ✓ V_{max} (KBr disque, cm⁻¹): 1600 (N = N), 1434,9 (Ar-F), 1174,6 (P = O).
- ✓ δF (54,6 MHz, CDCl₃): -76,5 (1F, d, J = 21.2Hz, F-4), -9,4 (1F, d, J = 21.2Hz, F-1)
- ✓ δH (300 MHz; CDCl₃): 2,3 (3H, s, 7-CH₃), 2,52 (3H, s, 9-CH₃), 2,76 (1H, HCHPO), 3,0 (1H, HCHPO), 3,4 (2H, s, H-CH₂), 7,1 (1H, s, H-8), 7,12 (1H, s, 10-H), 7,02 à 7,85 ((10H, m, Ha).

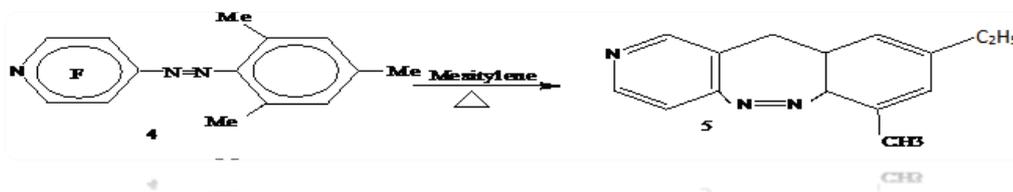


Figure 13 : Synthèse de diazépine (B)



Figure 14 : Le composé du diazépines (B)

II. *Activité Biologique*

II.1. Matériels et méthodes du test biologique:

II.1.1. Matériels :

Nous avons utilisé pour l'étude de l'activité biologique des diazépines, trois (03) souches bactériennes.

II.1.1.1. Provenance des souches bactériennes:

Les souches bactériennes utilisées dans notre étude, sont : constituées de

- ✓ Escherichia coli
- ✓ Pseudomonas aeruginosa
- ✓ Staphylococcus aureus

Nous avons testé l'activité antibactérienne des diazépines avec trois souches bactériennes qui proviennent du laboratoire d'analyse médicales du Mr. Bachir Abid à El Oued.

II.1.1.2 Principales caractéristiques des Souches bactériennes testées:

Escherichia coli :

Escherichia coli, autrement appelé colibacille, c'est un bacille mobile à gram négatif qui appartient à la famille des enterobacteriaceae, c'est un hôte commun de la microflore commensale intestinale de l'homme, c'est un germe le plus fréquemment responsable d'infections urinaires, cette bactérie est aussi à l'origine de septicémies, de méningites chez le nourrisson ainsi que de manifestations intestinales telles que les diarrhées [36], elle n'est pas pathogène à l'état normal, dans certains cas, elle peut acquérir une virulence très grande et engendrer des infections urinaires, elle produit habituellement de l'indole, fermente le lactose, mais ne produit pas d'acétoïne.

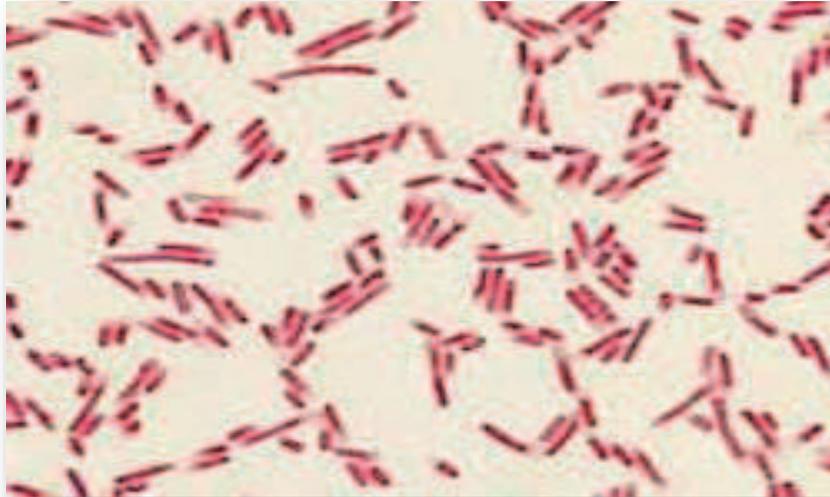


Figure 15 : Aspect microscopique d'Escherichia coli

✚ Pseudomonas aeruginosa:

Pseudomonas est un genre bactérien composé de bacilles mobiles, à gram négatif, aérobies stricts, il comporte un nombre important d'espèces, l'espèce la plus fréquemment responsable d'infections humaines est pseudomonas aeruginosa ou bacille pyocyanique, l'une de ses caractéristiques principales est la production d'un pigment bleu ou pyocyanine, c'est une bactérie très répandue dans la nature, elle vit normalement à l'état saprophyte dans l'eau et le sol ou sur les végétaux, elle fait partie de la flore commensale de l'homme, elle est responsable de redoutables infections hospitalières ou nosocomiales surtout chez les malades affaiblis aux défenses diminuées ou ayant une affection sévère (cancer, diabète, brûlures...) [37].



Figure 16 : Aspect microscopique de *Pseudomonas aeruginosa*

+ Staphylococcus aureus:

C'est une bactérie en forme de sphère qui fait partie des cocci à Gram positif classiquement disposés en amas, ces cocci appartiennent à la famille des micrococcaceae et se présentent comme des germes immobiles qui se caractérisent par leur regroupement rappelant celui des grains d'une grappe de raisins.

Staphylococcus est un germe ubiquitaire, retrouvé dans le sol, l'air et l'eau. Les staphylocoques sont des bactéries qui colonisent très largement la peau et les muqueuses de l'homme, ils sont pathogènes et responsables d'infections diverses superficielles ou profondes: intoxications, infections urinaires, septicémies et pneumopathies [38].

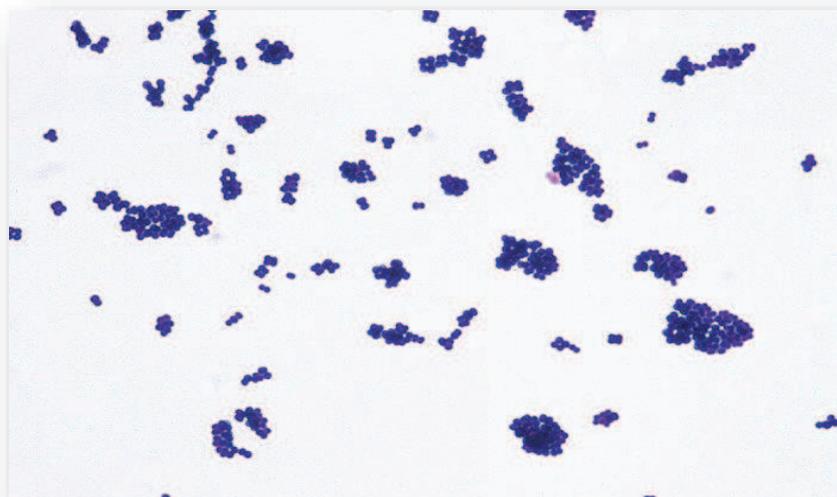


Figure 17 : Aspect microscopique de Staphylococcus aureus

- Le tableau.1 résume les caractéristiques les plus importantes des bactéries utilisées et leur profil de sensibilité.

Tableau 1: Caractéristiques des bactéries utilisées [24].

Les bactéries utilisées	Caractéristiques des bactéries		
	Selon l'exigence	Selon Gram	Selon le profil de sensibilité vis-à-vis les antibiotiques
Escherichia coli	Bactéries non exigeantes	Gram -	Souches de références
Pseudomonas aeruginosa		Gram -	
Staphylococcus aureus		Gram +	

II.1.1.3 Matériels chimiques :

La préparation de deux composés qu'on a utilisés dans notre travail, consulter pour: Chapitre I, matériel et méthodes, synthèse des diazépines correspondantes.

II.1.1.4 Milieux pour les cultures bactériennes:

Pour les cultures bactériennes, nous avons choisi plusieurs milieux:

- Le bouillon nutritif (B.N)
- Gélose nutritive
- Boîtes de pétri avec milieu de Mueller Hinton
- Etuve ventilée Memmert type : SLE 400
- Bec Bunsen, pipeteur de sécurité, étaloirs, pinces fines, pipettes Pasteur, récipient avec eau de Javel.

Toutes les manipulations seront faites dans la zone de stérilité du bec Bunsen, boîtes ouvertes le moins longtemps possible.

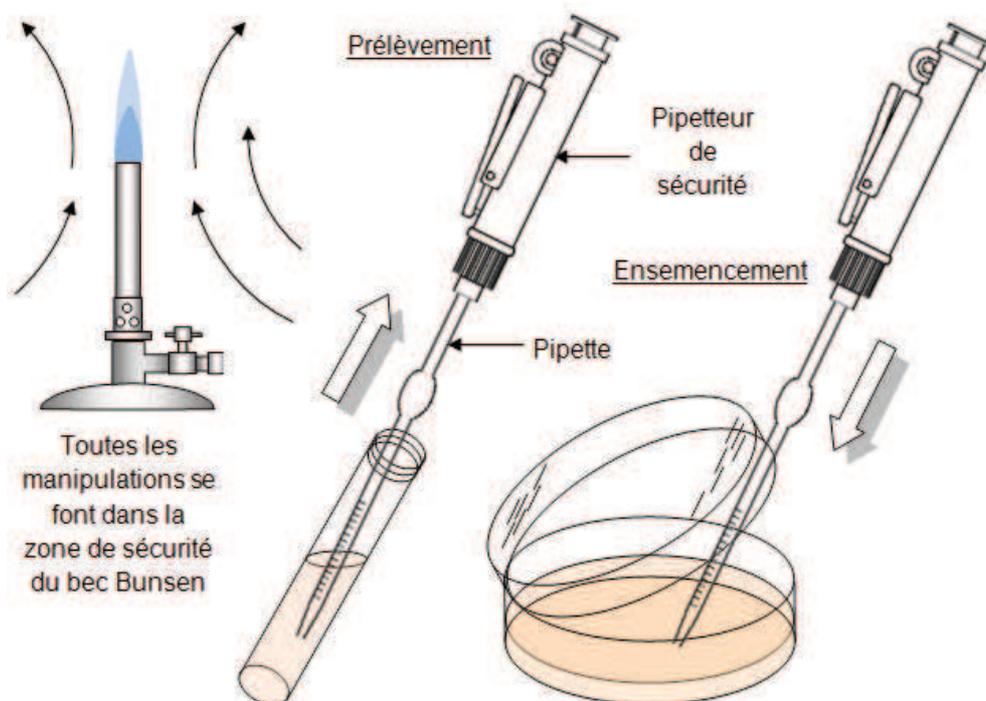


Figure 18 : Ensemencement des boîtes de pétri

II.1.2. Méthodes

II.1.2.1. Préparation des solutions :

Nous avons les composés suivants:

- Les diazépines (A)
- Les diazépines (B)

Pour le composé (A) :

Nous avons pris les échantillons d'un composé A (50, 80, 100) mg et le mettre dans Erlenmeyer (fiolle), en ajoute l'eau jusqu'à 100 ml distillée avec chauffage et mélangez bien la solution.

Enfin, nous obtenons la concentration de la solution égale à (500, 800, 100) ppm.

Pour le composé (B) :

Nous avons pris les échantillons d'un composé B (50, 80, 100) mg et le mettre dans Erlenmeyer (fiolle), en ajoute l'eau jusqu'à 100 ml.

Enfin, nous obtenons la concentration de la solution égale à (500, 800, 100) ppm.

Tableau 2: Préparation des solutions

Composé Valeurs	Poids (mg)	Volume d'eau (ml)	Concentration (ppm)
Les diazépines	50	100	500
	80		800
	100		1000

II.1.2.2. Preparation des disques :

A l'aide du papier filtre N°3, on prépare des disques de 5 mm de diamètre, on les dépose dans un tube à essai pour stérilisation à l'étuve pendant 45 min à 130°C.

II.1.2.3. Préparation des milieux d'ensemencement :

Dans les 15 minutes suivant l'ajustement de la turbidité de la suspension servant d'inoculum, on a trempé un écouvillon dans la suspension et on a étalé la surface entière de la gélose (Gélose Mueller Hinton et gélose Mueller Hinton au sang) à trois reprises, en tournant la boîte à environ 60° après chaque application dont le but d'avoir une distribution égale de l'inoculum, Enfin, on a écouvillonné partout autour du bord de la surface de la gélose.

A noter que toutes les manipulations se font dans la zone de stérilité du bec bunsen, et les boîtes ouvertes le moins longtemps possible, après fondement, le milieu muller hinton, est versé dans les boîtes de pétri à raison de 10 ml/boîte, laissé pour se solidifier puis séché à l'étuve pendant 30 min (afin d'éliminer l'humidité résiduelle).

II.1.2.4. Préparation de la culture bactérien :

On prend un échantillon de la souche, on le met dans un tube à essai contenant une quantité suffisante d'eau (10 ml), on agite jusqu'à homogénéiser la solution, avec le pipetteur et une pipette pasteur passée à la flamme, on prélève une petite quantité (2 gouttes) dans le tube de culture (par exemple d'escherichia coli) et on dépose le liquide à 2 cm du bord de la boîte de Pétri « milieu MH » le tube de culture est passé à la flamme avant d'être refermé, à l'aide de l'étaioirs, on répand le liquide sur toute la surface de la gélose, (faire tourner la boîte).

Les boîtes de pétri sont laissées pour 10 min puis séchées à l'étuve pendant 10 min à 37°C.

II.1.2.5. Culture et Incubation :

On imprègne les disques dans les différentes solutions-tests, les laisse un peu de temps puis les met dans les boîtes de Pétri, il faut laisser des espaces entre les disques, les boîtes de Pétri sont placées à l'envers dans l'étuve à 37°C pendant 24 heures.

II.1.2.6. Expression des résultats :

L'activité antibactérienne a été déterminée en mesurant à l'aide d'une règle le diamètre de la zone d'inhibition, déterminé par les différentes concentrations des différents extraits autour des disques.

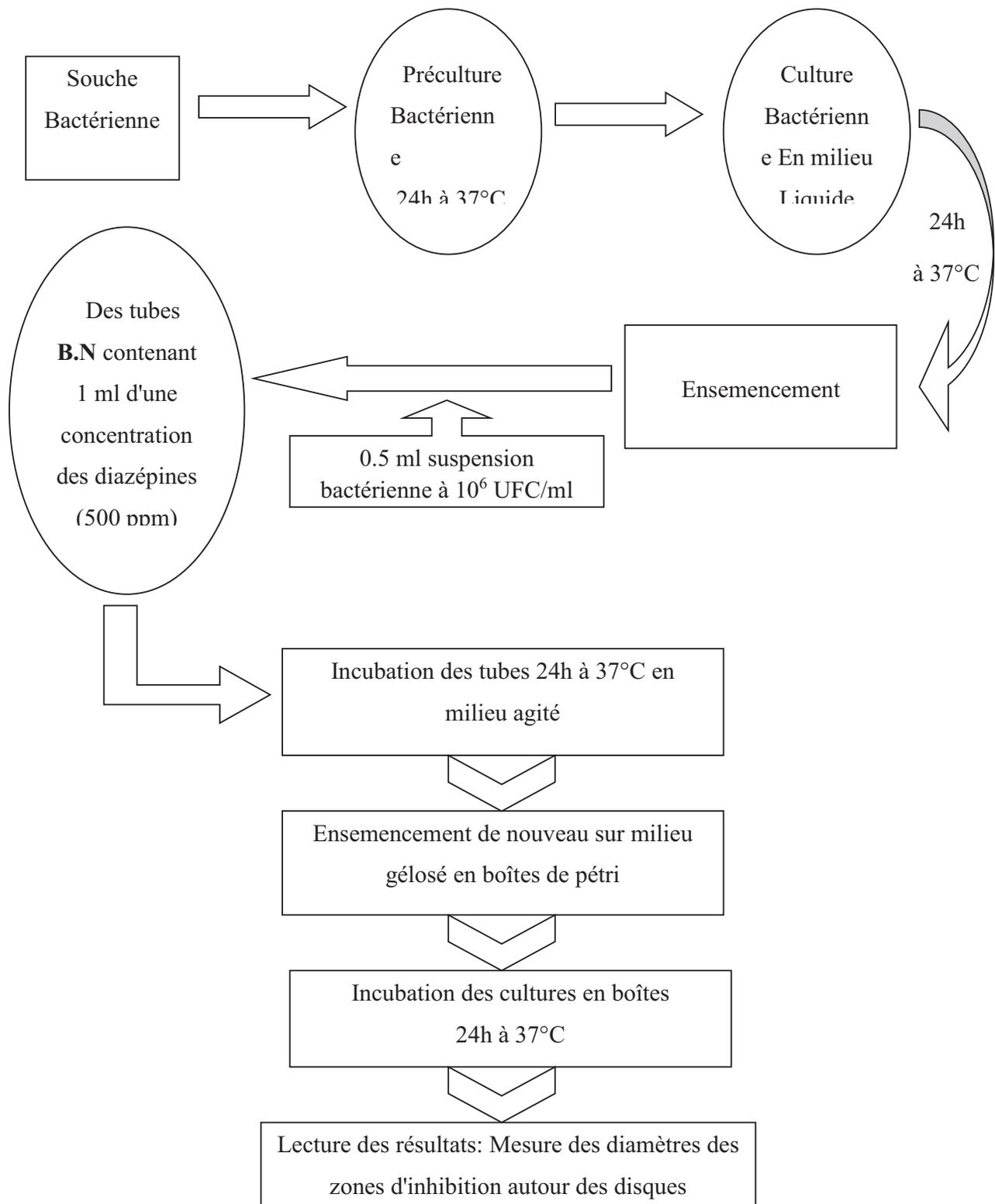


Figure 19: Etapes du test d'activité antibactérienne

Chapitre V

Résultats et discussion

I.1. La méthode de l'Antibiogramme :

La lecture des résultats est effectuée en fonction de l'existence ou non des zones d'inhibition, la sensibilité des espèces est estimée par la mesure du diamètre de zone d'inhibition autour des disques imprégné différentes concentrations des diazépines.

Trois cas sont possibles :

 **Souche sensible (S)** : La dimension du diamètre de la zone d'inhibition est égale ou supérieure à 10 mm

 **Souche limite (intermédiaire) (I)** : La dimension du diamètre de la zone d'inhibition est inférieure à 10 mm

 **Souche résistante (R)** : Absence de zone d'inhibition

I.2. Résultats des tests bactériologiques :

Après 24 h à 37°C d'incubation, l'effet des diazépines est estimé par la présence ou l'absence de la croissance bactérienne, l'affichage vis-à-vis avec des diazépines, pour chacune des différentes souches des bactéries (la souche d'*Escherichia coli*, *Pseudomonas Aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*).

I.3. Résultats de la détermination des diamètres d'inhibition de chaque souche:

Dans cette partie, nous allons discuter l'efficacité de l'effet du composé des diazépines sur chaque souche des bactéries, les résultats sont présentés dans les tableaux suivants:

I.3.1. les diamètres d'inhibition d'Escherichia coli :

Les résultats présentés dans le tableau et les figures ci-dessous montrent que : les diazépines (A) et (B) contre Escherichia coli. (Figure 15, Figure 16)

On a :

S (++) : La souche est sensible à ce composé.

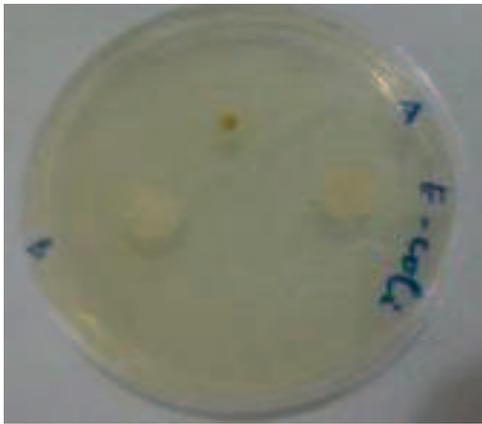
I (+) : La souche est intermédiaire à ce composé.

R (-) : La souche est résistante à ce composé.

Tableau 3: Diamètres (Φ) des zones d'inhibition d'Escherichia coli, après 24h d'incubation à 37°C

composé valeurs	Concentration (ppm)	Diamètres (Φ) des zones d'inhibition (mm)	catégorie de la souche
Les diazépines (A)	500	0	R (-)
	800	0	R (-)
	1000	9	I (+)
Les diazépines (B)	500	0	R (-)
	800	0	R (-)
	1000	12.5	S (++)

✚ Les figures avant et après le travail expérimental

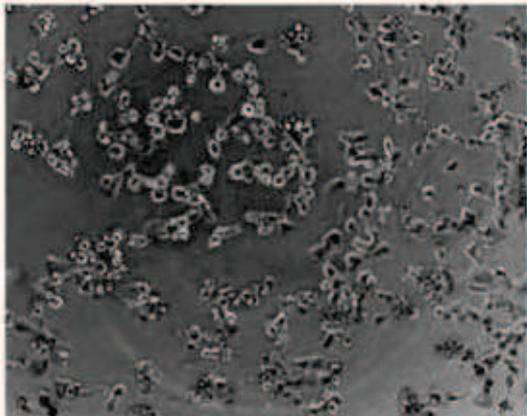


Escherichia coli (500 et 800) ppm
(Témoin)

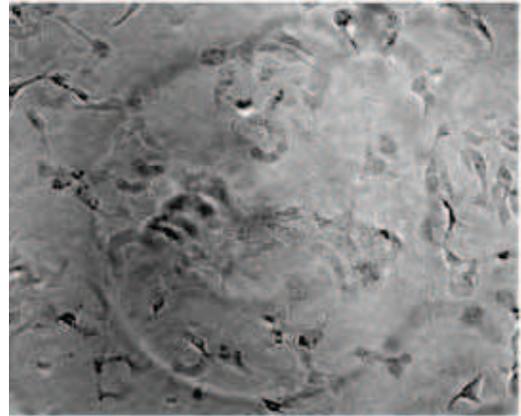


Escherichia coli (500 et 800) ppm
(Testée)

Figure 20 : Inhibition de la croissance d'Escherichia coli en présence des diazépines (A) et (B)



Escherichia coli en présence diazépines A
(1000) ppm



Escherichia coli en présence diazépines B
(1000) ppm

Figure 21 : Inhibition de la croissance d'Escherichia coli en présence des diazépines on (A) et (B)

➤ **Discussion :**

Après 24h d'incubation à 37°C, on conclut que le produit synthétisé (les diazépines A et B), n'a aucune influence sur *Escherichia coli* à une concentration 500 et 800 (ppm) donc, on peut classer d'*Escherichia coli* dans la catégorie des souches résistante à ce composé (les diazépines A et B).

Mais à la concentration 1000 (ppm) pour les deux composés (A et B), les résultats ont montré une réaction positive pour le composé (A) et le composé (B) sur d'*Escherichia coli*, où elle était sensible au composé (B), est intermédiaire au composé (A)

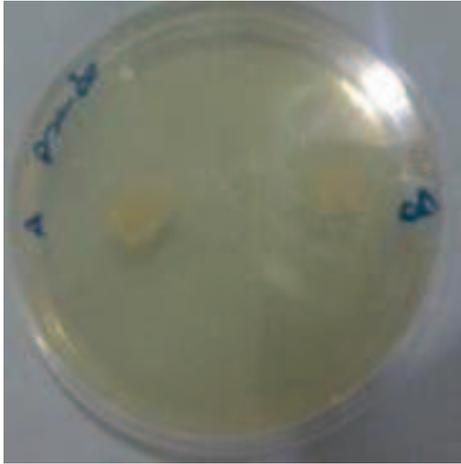
I.3.2. les diamètres d'inhibition (*Pseudomonas Aeruginosa*) :

Les résultats présentés dans le tableau et les figures ci-dessous montrent l'effet de chacun des diazépines (A) et (B) sur (*Pseudomonas Aeruginosa*) il résistante. (Figure 17, figure 18)

Tableau 4: Diamètres (Φ) des zones d'inhibition (*Pseudomonas Aeruginosa*), après 24h d'incubation à 37°C

composé valeurs	Concentration (ppm)	Diamètres (Φ) des zones d'inhibition (mm)	catégorie de la souche
Les diazépines (A)	500	0	R (-)
	800	0	
	1000	0	
Les diazépines (B)	500	0	R (-)
	800	0	
	1000	0	

✚ Les figures avant et après le travail expérimental



Pseudomonas Aeruginosa (500 et 800) ppm
(Témoin)



Pseudomonas Aeruginosa (500 et 800) ppm
(Testée)

Figure 22 : Inhibition de la croissance (Pseudomonas Aeruginosa) en présence de les diazépines (A et B).



Pseudomonas Aeruginosa (1000) ppm
(Testée)

Figure 23 : Inhibition de la croissance (Pseudomonas Aeruginosa)
En présence des diazépines (A et B).

➤ **Discussion :**

Après 24h d'incubation à 37°C, on conclut que le produit synthétisé (les diazépines A et B), n'a aucune influence sur (*Pseudomonas Aeruginosa*) à une concentration 500, 800 et 1000 (ppm), donc, on peut classer (*Pseudomonas Aeruginosa*) dans la catégorie des souches résistante aux diazépines (A et B).

I.3.3. les diamètres d'inhibition (*Staphylococcus aureus*) :

Les résultats présentés dans le tableau et les figures ci-dessous montrent que : les diazépines (A) et (B) contre *staphylococcus aureus*. (Figure 19).

Tableau 5: Diamètres (Φ) des zones d'inhibition (*Staphylococcus aureus*), après 24h d'incubation à 37°C

composé valeurs	Concentration (ppm)	Diamètres (Φ) des zones d'inhibition (mm)	catégorie de la souche
Les diazépines (A)	500	0	R (-)
	800	0	R (-)
	1000	15.5	S (++)
Les diazépines (B)	500	0	R (-)
	800	0	R (-)
	1000	10	I (+)

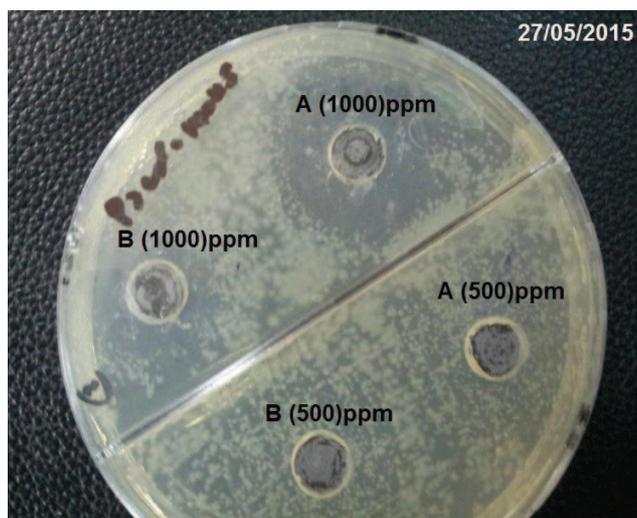


Figure 24: Inhibition de la croissance (*Staphylococcus aureus*)
En présence des diazépines (A et B).

➤ **Discussion :**

Après 24h d'incubation à 37°C, on conclut que le produit synthétisé (les diazépines A et B), n'a aucune influence sur (*Staphylococcus aureus*) à une concentration 800 (ppm).

Mais après il l'augmentation de la concentration à 1000 (ppm) pour les deux composés (A et B), les résultats ont montré une réaction positive pour le composé (A) et le composé (B) sur (*Staphylococcus aureus*), où elle était sensible au composé (A), est intermédiaire au composé (B).

CONCLUSION GÉNÉRALE

Conclusion générale

Dans ce travail, nous avons évoqué la question des antibiotiques, leurs types, leurs classifications et leurs domaines d'utilisation médicale. En outre, nous avons aussi évoqué les bactéries, les types les plus importants, leurs caractéristiques et leurs composantes, ainsi que leurs résistances face à certains types d'antibiotiques.

Nous avons mis l'accent sur les composés (les diazépines), sur leurs ses importances biologiques et ses domaines d'utilisation en chimie pharmaceutique moderne.

Dans notre partie pratique, nous avons préparé deux composés de (diazépines) avec deux compositions différentes, et nous avons testé leurs activités biologiques sur trois types de bactéries (la souche d'*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*).

Lors des essais, les résultats ont été négatifs pour les deux composés A et B à une concentration de 500 et 800 où les bactéries ont montré une résistance pour chacun des deux composés, mais après la levée de la concentration à 1000 pour les deux composés, les résultats ont été positifs pour chacun des (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*), et négatifs pour les bactéries (*Staphylococcus aureus*). .

Enfin, nous proposons l'orientation du travail, à l'avenir, pour le composé (diazépines) Et le test de son efficacité biologique sur d'autres types de bactéries, surtout celles qui se trouvent dans les produits alimentaires.

*Références
bibliographiques*

- [1] A.Baurer, W. Kirry, Sherris J.C.A., Turch M., Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method, *Amer. J. Clin. Pathol*, (1966), 45, 493-496
- [2] V. Guerin-Faubleé, C.Carret, L'antibiogramme : principes, méthodologie, intérêt et limites, (1999) Journées nationales GTV-INRA.
- [3] Antibiotique.eu, Définition de l'antibiotique, [20 Mars 2015], [http:// www. antibiotique.eu /deacutefinition--histoire.html](http://www.antibiotique.eu/deacutefinition--histoire.html)
- [4] Les mots antibiose et antibiotique (dans « action antibiotique ») ont été formés par Vuillemin. (P. Vuillemin, *Antibiose et symbiose*, Association française pour l'avancement des sciences, compte rendu de la 18e session, seconde partie, Notes et mémoires, vol. 11 (1890), p. 525-543.) Sur l'évolution sémantique subséquente du mot antibiotique en anglais, voir (en) R. Bentley et J.W. Bennett, « What is an Antibiotic? Revisited », *Advances in applied microbiology*, vol. 52, 2003, p. 303-331, spéc. 304, 312 et 330.
- [5] (En) Ronald Bentley et J.W. Bennett, « What Is an Antibiotic? Revisited », *Advances in Applied Microbiology*, vol. 52, 2003, p. 303-331 (DOI 10.1016/S0065-2164(03)01012-8, lire en ligne
- [6] RAACHE Imane ; Synthèse d'acétanilide et l'étude de son effet synergique avec le noyau de l'acide 6-Aminopénicillanique ; Mémoire de fin d'études (1012), Université de Ouargla.
- [7] Infirmiers, La communauté infirmière, [20 avril 2015], <http://www.infirmiers.com/etudiants-en-ifs/cours/cours-pharmacologie-lesantibiotiques.html>
- [8] Tunisia-Sat, Forums, [22 avril 2015], <https://www.tunisia-/com/vb/showthread.php?t=195835>
- [9] (En) W. McDermott et D.E. Rogers, « Social ramifications of control of microbial disease », *The Johns Hopkins Medical Journal*, vol. 151, 1982, p. 302-312
- [10] Fr.wikipedia, antibiotique, [23 avril 2015], [http://fr. wikipedia.org/wiki/ Antibiotique# Inhibition_de_la_synth.C3.A8se_des_acides_nucl.C3.A9iques](http://fr.wikipedia.org/wiki/Antibiotique#Inhibition_de_la_synth.C3.A8se_des_acides_nucl.C3.A9iques)
- [11] Microbes-edu. Cours de bactériologie générale. [06 mai 2015]. [http://www.microbes- edu. org/etudiant/antibio1.html](http://www.microbes-edu.org/etudiant/antibio1.html)
- [12] Fr.wikipedia. Antibiotique. [06 mai 2015]. <http://fr.wikipedia.org/wiki/Antibiotique>
- [13] Van Leeuwenhoek A, « An abstract of a letter from Mr. Anthony Leevvenhoek at Delft, dated Sep. 17, 1683, Containing Some Microscopical Observations, about Animals in the Scurf of the

Teeth, the Substance Call'd Worms in the Nose, the Cuticula Consisting of Scales », *Philosophical Transactions* (1683–1775), vol. 14, 1684, p. 568–574

[14] Van Leeuwenhoek A, « Part of a Letter from Mr Antony van Leeuwenhoek, concerning the Worms in Sheeps Livers, Gnats, and Animalcula in the Excrements of Frogs », *Philosophical Transactions* (1683–1775), vol. 22, 1700, p. 509–518

[15] Woese C, Kandler O, Wheelis M (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci USA* 87(12):4576-9

[16] « Etymology of the word « bacteria » » [archive], *Online Etymology dictionary* (consulté le 23 novembre 2006)

[17] Fr.Wikipedia. Paroi cellulaire. [09 mai 2015]. http://fr.wikipedia.org/wiki/Paroi_cellulaire

[18] Fr.wikipedia. Membrane plasmique. [09 mai 2015]. http://fr.wikipedia.org/wiki/Membrane_plasmique.

[19] Lodish et al, *Biologie moléculaire de la cellule*, 4ème édition pour la traduction, Paris, De Boeck, 2014, p. 13

[20] Fr.Wikipedia. Pilus. [09 mai 2015]. <http://fr.wikipedia.org/wiki/Pilus>

[21] Auto-etudes.up, classification des bactéries, [09 mai 2015], <http://auto-etudes.up-with.com/t30-classification-des-bacteries>.

[22] 123bio.net, Introduction à la taxonomie bactérienne, [09 mai 2015], <http://www.123bio.net/cours/bacterio/taxonomie.html>

[23] Ecosociosystemes, classification des bactéries, [09 mai 2015], http://www.ecosociosystemes.fr/classification_bacterienne.html

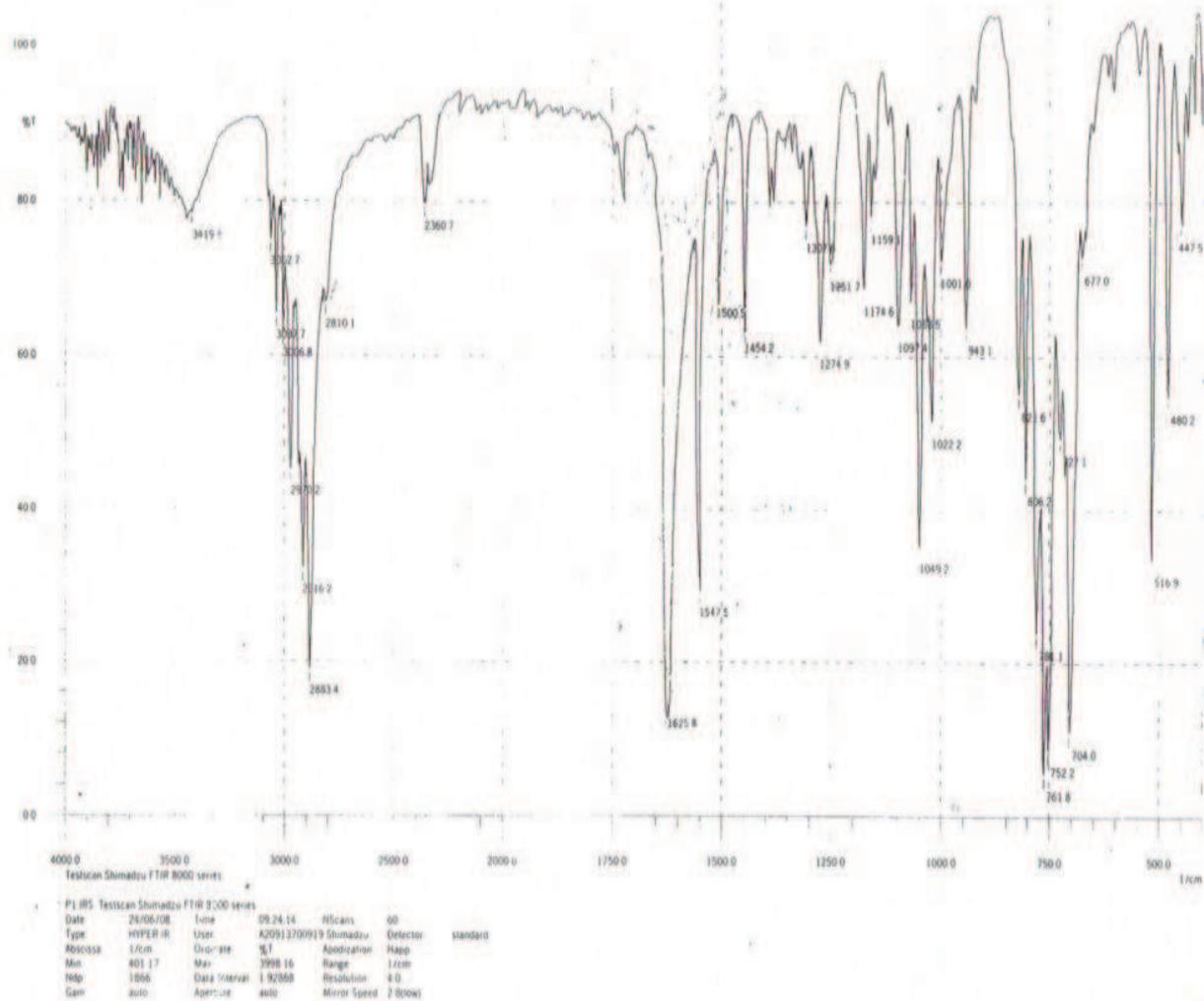
[24] Bacterioweb.univ, Introduction à la Bactériologie: Les disciplines microbiologiques, [09 mai 2015], http://bacterioweb.univ-fcomte.fr/cours_dcem1/intro_bacterio.htm

[25] Sante.Lefigaro, bactéries, [09 mai 2015], <http://sante.lefigaro.fr/sante/maladie/resistances-antibiotiques/quest-ce-que-resistance-antibiotiques>

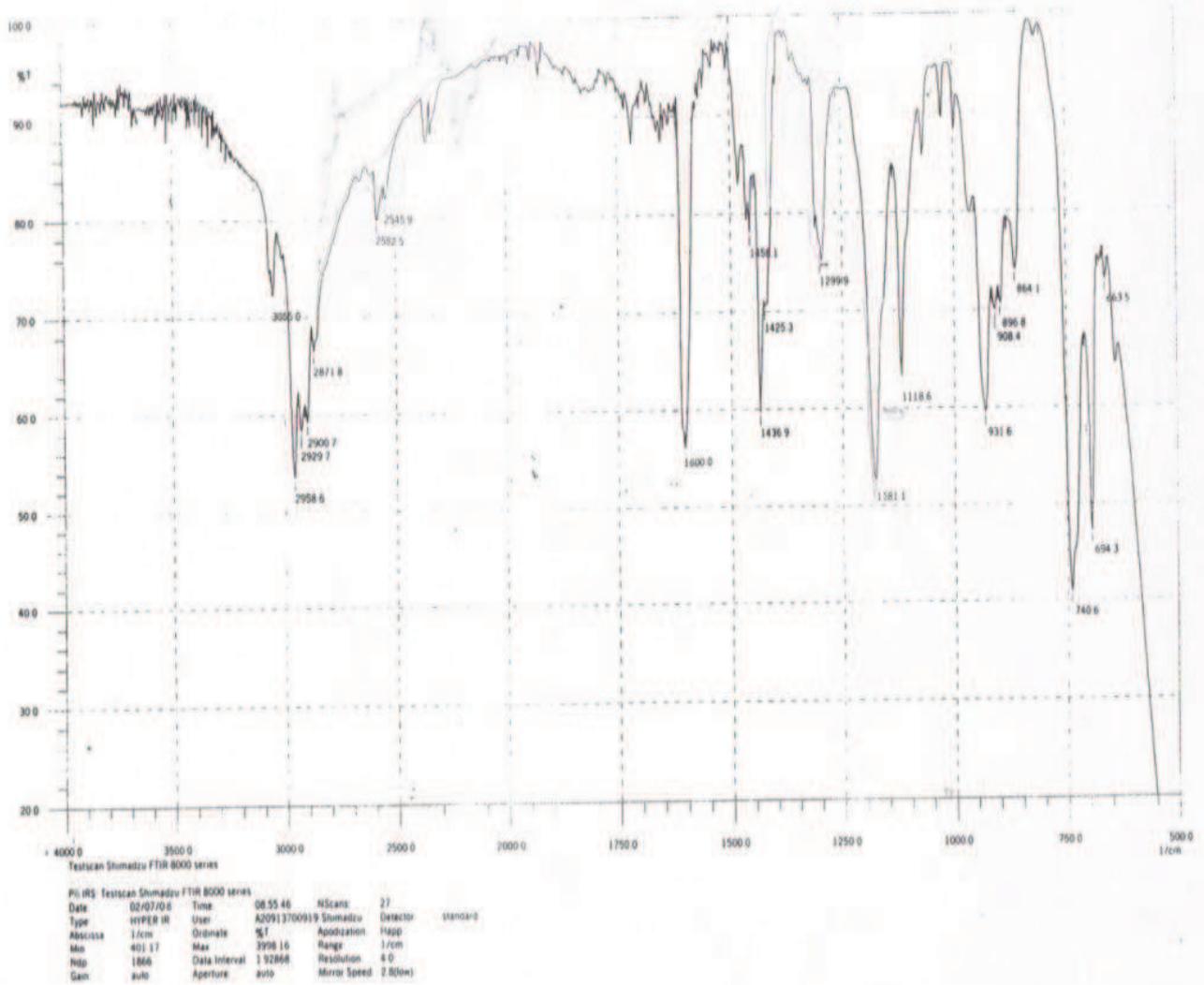
[26] Eurekasante, La résistance aux antibiotiques, [09 mai 2015], <http://www.eurekasante.fr/medicaments/antibiotiques/resistance-antibiotiques.html>

- [27] Microbes, Phenotypes de resistance naturelle, [09 mai 2015], <http://www.microbes-edu.org/mecanisme/pheno1/som.html>
- [28] soins-infirmiers, Les défenses de l'organisme contre l'infection, [09 mai 2015], http://www.soins-infirmiers.com/defense_organisme_contre_infection.php#Les_resistances_naturelles
- [29] Academia.edu, Synthesis and characterization of new 1,2-diazepine derivative, [11 mai 2015], http://www.academia.edu/2949739/Synthesis_and_characterization_of_new_1_2diazepine_derivative.
- [30] Dictionnaire.Acadpharm, Academie Nationale Pharmacie, Diazepine, [12 mai 2015], <http://dictionnaire.acadpharm.org/w/Diaz%C3%A9pine>.
- [31] Fr.Wikipedia, Diazépine, [13 mai 2015], <http://fr.wikipedia.org/wiki/Diaz%C3%A9pine>
- [32] Doctissimo, Guide Des Médicaments, Diazépines et oxazépines, [13 mai 2015], <http://www.doctissimo.fr/classe-PHD-DIAZEPINES-ET-OXAZEPINES.htm>.
- [33] Fr.Wikipedia, Benzodiazépines, [14 mai 2015], <http://fr.wikipedia.org/wiki/Benzodiaz%C3%A9pine>
- [34] Tpebenzodiazepines, Structure de la molécule de benzodiazépine, [14 mai 2015], <https://tpebenzodiazepines.wordpress.com/molecule-de-benzodiazepine/>
- [35] pharmacorama, Benzodiazépines, [15 mai 2015], http://www.pharmacorama.com/Rubriques/Output/Acides_amines4_1.php
- [36] Evans, J., Doyle, J., Dolores, Evans, G., Escherichia Coli, Medical Microbiology, The University of Texas Medical Branch at Galveston, 4th Ed, 2007.
- [37] Meyer, K.C., Zimmerman, J., Neutrophil mediators, J. Lab. Clin. Med. , 1993, 121, 654.
- [38] Singh, V., Utaida, S., Jackson, L., Jayaswal, R., Wilkinson, B., Chamberlain, N., Microbiology, 2007, 153, 3162.

Annexes



Le spectre infrarouge des diazépines (A)



Le spectre infrarouge des des diazépines (B)



Balance analytique



Pipette



Germe d'Escherichia coli



Autoclave



Etuve



Eau stérile