



Université Sidi Mohammed Ben Abdellah
Faculté des Sciences et Techniques de Fès
www.fst-usmba.ac.ma

Année Universitaire : 2017-2018

Master Sciences et Techniques : Biotechnologie Microbienne
MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

**Evaluation de l'activité antibactérienne des dérivés de
tétrazoles sur des souches isolées du milieu hospitalier**

Présenté par :

HSSAINI Mohamed

Encadré par :

Mme. BENCHEMSI Najoua
Mr. BEKKARI Hicham

Soutenu le :

Mercredi 13 juin 2018

Devant le jury composé de :

<i>Mme. BENCHEMSI Najoua</i>	<i>FST Fès</i>	<i>Présidente</i>
<i>Mr. BEKKARI Hicham</i>	<i>FSDM Fès</i>	<i>Examineur</i>
<i>Mr. El Farricha Omar</i>	<i>FST Fès</i>	<i>Examineur</i>

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FES

☒ B.P. 2202 – Route d'Imouzzer – FES

☒ 212 (35) 60 80 14 – 212 (35) 60 96 35 – 212 (35) 60 29 53 – Fax : 212 (35) 60 82 14



Dédicace

À mes chers parents

Aucune dédicace ne saurait exprimer le sentiment de gratitude que je vous porte.

Vos sacrifices, votre tendresse et vos conseils m'ont aidé à surmonter tous les obstacles qui se sont dressés sur mon chemin. Que Dieu vous protège et vous procure une longue vie.

À mes chers frères et sœurs, à toute la famille.

Veillez trouver ici l'expression de l'amour et de l'intime attachement que je vous porte.

À mes ami(e)s qui m'ont permis d'oublier les moments de stress et de découragement. Qu'ils trouvent dans ce travail les sincères témoignages de mon profonde affection et de ma haute considération.

À tous ceux qui me sont chers,

À vous tous, je dédie le fruit de ce travail

Remerciements

C'est grâce à la volonté et l'aide d'ALLAH le Tout Puissant, que ce modeste projet a pu être réalisé, Dieu merci pour m'avoir donné la foi et la force à achever ce projet.

Le présent travail n'aurait pu avoir lieu sans la contribution de plusieurs personnes. Je tiens à exprimer ma profonde gratitude en remerciant tous ceux qui m'ont aidé à bien mener ce travail.

Le présent travail a été réalisé au laboratoire de biotechnologie de la faculté des sciences Dher El Mhraz (FSDM) de Fès.

*C'est avec beaucoup de plaisir que J'exprime mes profonds remerciements et ma vive reconnaissance à mon cher encadrant **Mr. Bekkari Hicham** d'avoir accepté d'encadrer et de diriger mon projet de fin d'étude. Je le remercie également pour sa disponibilité, sa gentillesse, sa patience et pour le temps et l'intérêt qu'il a consacré pour ce travail.*

*J'ai le plaisir de présenter mes sincères remerciements à ma chère encadrante **Mme. Benchemsi Najoua**, à qui nous devons beaucoup d'estimation et de respect pour l'intérêt qu'elle a porté à ce travail et sa grande disponibilité à mon égard ainsi que ses judicieux conseils, ses orientations et ses encouragements durant toute la période de formation et de la réalisation de ce travail.*

*Mes remerciements vont également à **Mr. El Farricha Omar**, d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail, qu'il trouve ici l'expression de mes plus sincères remerciements et toute ma gratitude.*

*Mes remerciements les plus sincères s'adressent à **Mr. Iraqui Housaini Mohammed**, notre coordinateur du master Biotechnologie Microbienne et aussi à tous les enseignants qui ont participé de près ou de loin à la réussite de cette formation.*

*Mes vifs remerciements s'adressent aussi à **Mlle Touijer Hanane**, doctorante à la FSDM qui m'a accompagné au cours du stage pour son aide et ses informations gravés dans mon esprit.*

Enfin, j'adresse des sincères remerciements à tous mes ami(e)s et mes collègues pour leur amitié et leur soutien précieux.

Liste des figures

	Page
Figure 1 : Tétrazole simple : 1-H Tétrazole	3
Figure 2 : Comparaison entre le tétrazole et l'acide carboxylique	3
Figure 3 : Les deux formes tautomériques de tétrazoles 5-substitués	4
Figure 4 : Structure de deux tétrazoles antibactériens	5
Figure 5 : Structure de tétrazole antifongique	5
Figure 6 : Structure des tétrazoles Anti-EV71 (a) et anti-VIH (b).....	6
Figure 7 : Structure de tétrazole anticancéreux	6
Figure 8 : Structure des tétrazoles présents dans les médicaments.....	7
Figure 9 : Préparation de tétrazole à partir de nitrile et l'azoture de sodium.....	7
Figure 10 : Préparation de tétrazole à partir de nitrile et l'azoture de sodium sous irradiation	8
Figure 11 : Préparation de tétrazole à partir d'oxime.....	8
Figure 12 : Préparation de tétrazole en présence d'acide de Lewis	8
Figure 13 : Préparation de tétrazole en présence de chlorure de zinc (ZnCl ₂) sans solvant.....	9
Figure 14 : Préparation de tétrazoles par l'azoture de triméthylsilyle sans solvant	9
Figure 15 : Etapes de synthèse des produits OXM (SB9) et TET (SB13).....	17
Figure 16 : Schéma de la réalisation de la méthode de diffusion sur disque	18
Figure 17 : Expression de l'activité des deux produits SB 9 et SB 13 sur les souches bactériennes testées.....	25
Figure 18 : Expression des CMI en milieu liquide (Macrodilution).....	29

Liste des tableaux

	Page
Tableau 1 : Diamètres des halos d'inhibition du SB 9 et SB 13 contre les souches ATCC.....	24
Tableau 2 : Diamètres des halos d'inhibition du SB 9 et SB 13 contre les souches d'origines hospitalières.....	24
Tableau 3 : Concentrations minimales inhibitrices du SB 9 sur les souches ATCC	26
Tableau 4 : Concentrations minimales inhibitrices du SB 13 sur les souches ATCC	26
Tableau 5 : Concentrations minimales inhibitrices du SB 9 sur les souches d'origines hospitalières.....	27
Tableau 6 : Concentrations minimales inhibitrices du SB 13 sur les souches d'origines hospitalières.....	28
Tableau 7 : Comparaison des CMI de SB 9 et SB 13 sur les souches testées.....	29
Tableau 8 : Concentrations minimales bactéricides du SB 9 sur les souches ATCC.....	29
Tableau 9 : Concentrations minimales bactéricides du SB 13 sur les souches ATCC.....	30
Tableau 10 : Concentrations minimales bactéricides du SB 9 sur les souches d'origines hospitalières.....	30
Tableau 11 : Concentrations minimales bactéricides du SB 13 sur les souches d'origines hospitalières.....	31

Liste des abréviations

% : Pourcentage

°C : Degré Celsius

µm : Micromètre

µl : Microlitre

µg : Microgramme.

anti-EV71 : Anti-Entérovirus 71

ATB : Antibiotique.

ATCC : American Type Collection Culture

BF₃ : Trifluorure de bore

CA-SFM : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

CLSI : Clinical & Laboratory Standards Institute

CMI: Concentration minimale inhibitrice.

CMB : Concentration minimale bactéricide.

DMF : *Diméthylformamide*

DMSO : Diméthyl sulfoxyde.

DO : Densité optique

ECAST : European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

g : gramme

h : heure.

LB : Lauria Bertani

mg : milligramme

ml : millilitre.

mm : millimètre.

min : minute.

NaN₃ : Azoture de sodium

SK-OV-3 : Type de lignée cellulaire du cancer de l'ovaire humain.

TBAF : Fluorure de Tétrabutylammonium

TMSN₃ : Azoture de Triméthylsilyle

UFC: Unité formant colonie

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

ZnCl₂ : Chlorure de zinc

Sommaire

Remerciement

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Sommaire

Introduction	1
Partie bibliographique	2
I. Généralité sur les tétrazoles.....	3
1. Définitions des tétrazoles.....	3
2. Propriétés physico- chimiques des tétrazoles.....	3
2.1.Aromaticité.....	3
2.2.Acidité.....	4
2.3.Solubilité.....	4
2.4.Autres propriétés des Tétrazoles.....	4
3. Application des tétrazoles.....	4
3.1.Activités biologiques des tétrazoles.....	4
a. Activité antibactérienne.....	5
b. Activité antifongique.....	5
c. Activité antivirale.....	5
d. Activité anti-cancéreuse.....	6
3.2.Applications pharmaceutique de tétrazoles et leurs dérivés.....	6
3.3.Autres applications des tétrazoles et leurs dérivés.....	7
4. Synthèse des tétrazoles.....	7
4.1.Synthèse des tétrazoles à partir des nitriles et d'azide de sodium	7
4.2.Synthèse des tétrazoles à partir d'oxime.....	8
4.3.Synthèse des tétrazoles en présence d'acide de Lewis.....	8
4.4.Synthèse des tétrazoles par la Méthode de Sharpless : Approche du (click chemistry).....	8
4.5.Synthèse des tétrazoles sans solvant.....	9
II. Généralités sur la microflore de l'environnement hospitalier.....	10

2.1.	<i>Escherichia coli</i>	10
2.2.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11
2.3.	<i>Staphylococcus aureus</i>	11
2.4.	<i>Streptococcus spp</i>	12
2.5.	<i>Bacillus subtilis</i>	12
III.	Résistance aux antibiotiques et aux désinfectants	13
Partie Matériels et méthodes.....		15
I.	Présentation d'étude.....	16
II.	Matériels	16
III.	Evaluation de l'activité antibactérienne des dérivés des tétrazoles.....	17
3.1.	Méthode de diffusion en milieu solide : Antibiogramme.....	17
3.1.1.	Principe.....	17
3.1.2.	Protocole expérimental.....	18
a.	Préparation des solutions mère des dérivés de tétrazoles.....	18
b.	Préparation de l'inoculum	18
c.	Inoculation des boîtes	18
d.	Dépôt des disques	18
3.2.	Détermination des concentrations minimales inhibitrices et bactéricides.....	19
3.2.1.	Détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI en milieu liquide...	19
a.	Principe	19
b.	Protocole expérimental.....	19
3.2.2.	Détermination de la concentration minimale bactéricide CMB en milieu solide..	21
IV.	L'analyse et traitement des données.....	21
Partie Résultats et discussion.....		22
I.	Evaluation de la sensibilité des bactéries aux produits chimiques par diffusion sur disque.....	23
1.1.	Mise en évidence de l'activité antibactérienne contre les souches ATCC.....	23
1.2.	Mise en évidence de l'activité antibactérienne contre les souches d'origines hospitalières.....	24
II.	Détermination des concentrations minimales inhibitrice CMI.....	26
2.1.	Concentrations minimales inhibitrice contre les souches de références ATCC.....	26
2.2.	Concentrations minimales inhibitrices contre les souches d'origines hospitalières.....	27

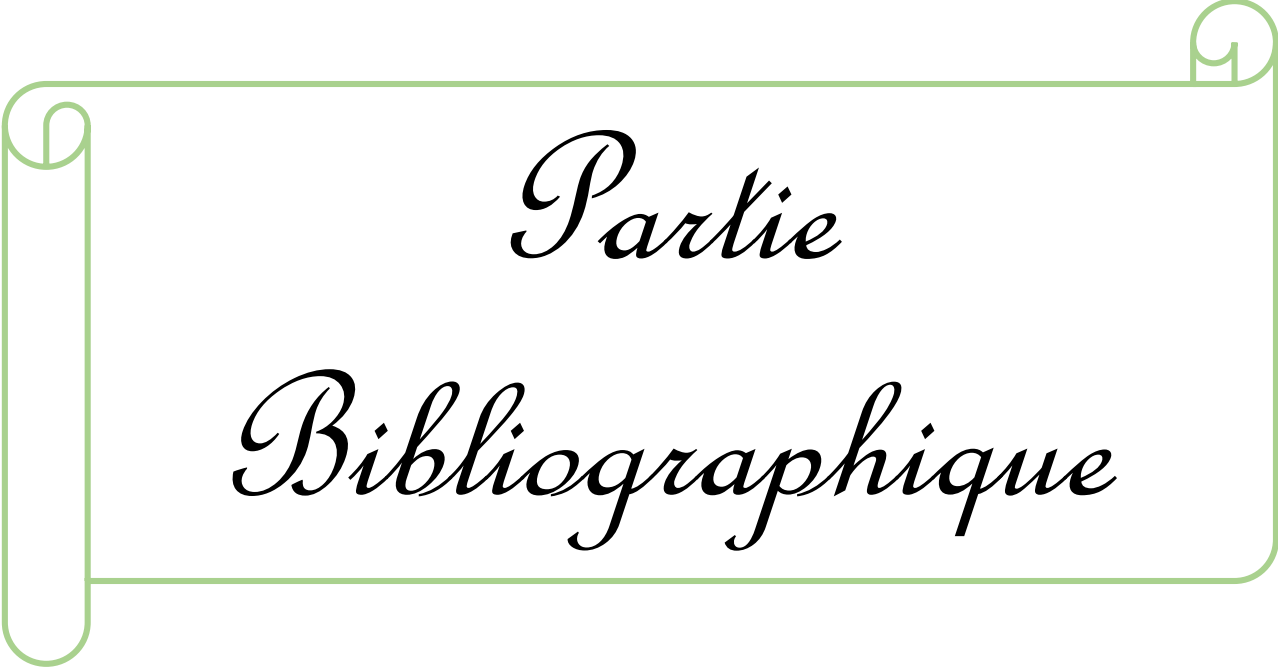
III. Détermination des concentrations minimales bactéricide CMB.....	29
3.1. Concentrations minimales bactéricides contre les souches de références ATCC....	29
3.2. Concentrations minimales bactéricides contre les souches d'origines hospitalières.....	30
Conclusion et perspectives	32
Références bibliographiques	34
Annexes	41
Résumé	

Introduction Générale

L'hôpital est un lieu de soin, mais également un lieu où on peut contracter des maladies infectieuses (**Diakaria, 2002**). La contamination contractée à l'hôpital est à l'origine des infections, dites nosocomiales. Cette dernière constitue un sérieux problème de santé publique avec des conséquences considérables tant sur le plan individuel que sur le plan économique (**El Rhazi et al., 2007**). Les bactéries peuvent être transmises par contact direct ou par l'environnement de l'hôpital (air, eau, aliments, matériels). La plupart des bactéries responsables de ces infections nosocomiales sont des bactéries multirésistantes (**Bekkari et al., 2016**). L'acquisition de la résistance bactérienne aux agents antimicrobiens, en particulier aux antibiotiques, est due à la surconsommation d'ATB en pratique médicale humaine, que ce soit en milieu hospitalier ou en communautaire. L'utilisation des désinfectants avec des concentrations subinhibitrices est aussi à l'origine d'une résistance bactérienne contre un ensemble des produits désinfectants (**Joly, 1996**).

Devant ce problème mondial qui augmente considérablement et qui constitue une menace majeure pour la santé publique, il est nécessaire de trouver de nouvelles molécules antimicrobiennes qui peuvent être la base de nouveaux antibiotiques ou désinfectants. En effet, la synthèse chimique de nouvelles molécules antibactériennes s'avère indispensable pour lutter contre les phénomènes de la résistance bactérienne. Durant ces dernières années, de nombreuses équipes de chercheurs se sont intéressées à la synthèse et l'étude de nouveaux composés hétérocycliques. Les tétrazoles constituent une classe importante de ces composés qui ont reçu beaucoup d'intérêts par leurs diverses activités biologiques en particulier : **l'activité antibactérienne** (**Salahuddin, 2009 ; Mosaad, 2009 ; Mohite, 2011 ; Boukhssas et al., 2017**). Les composés contenant un cycle tétrazole ont été synthétisés pour la première fois en 1885 par J. A. Bladin à l'Université d'Uppsala (Suède) (**Bladin, 1885**).

C'est dans ce cadre que s'inscrit le présent travail qui a pour objectif l'étude de l'effet antibactérien de deux produits chimiques synthétiques, dérivés de tétrazoles sur la croissance des souches de références ATCC et sur des souches isolées de l'environnement hospitalier.



Partie
Bibliographique

I. Généralité sur les tétrazoles

1. Définitions des tétrazoles

Les tétrazoles correspondent à une classe de composés hétérocycliques organiques constitués d'un cycle de cinq atomes ; quatre atomes d'azote et un atome de carbone (plus l'hydrogène). Le plus simple est le CN_4H_2 qui est un solide cristallin blanc à jaune pâle avec une odeur caractéristique faible, soluble dans l'eau et l'alcool. Il est de nature acide en raison de la présence de quatre atomes d'azote. La figure 1 représente la structure et la numérotation d'un tétrazole simple appelé aussi 1-H Tétrazole ou Tétrazacyclopentadiène (**Joule, 2000**).

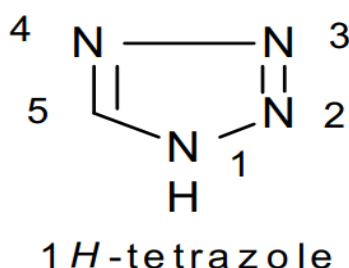


Figure 1 : Tétrazole simple : 1-H Tétrazole

Les tétrazoles sont des bioisostères de l'acide carboxylique. Comme ce dernier, ils sont ionisés à pH physiologique et exhibent une structure plane ce qui rend l'anion tétrazolate plus stable (**Herr, 2002**). Les bioisostères sont utilisés en conception de médicament afin d'accroître l'effet biologique ou physiologique recherché ou de réduire la toxicité du composé parent sans altérer significativement sa structure chimique (**Brown, 2012**). En effet, Hansch et Leo (1995) ont montré que les tétrazoles anioniques sont dix fois plus lipophiles que leurs carboxylates correspondants malgré leurs acidités similaires (Figure 2). Ce caractère lipophile est un facteur important permettant aux molécules de traverser les membranes cellulaires (**Herr, 2002**).

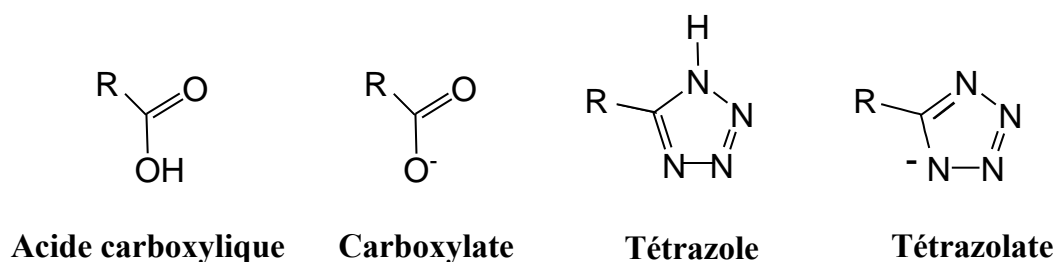


Figure 2 : Comparaison entre le tétrazole et l'acide carboxylique

2. Propriétés physico- chimiques des tétrazoles

2.1. Aromaticité

La réactivité des tétrazoles 5-substitués, leur permet d'être classés parmi les composés aromatiques (**Butler, 1984**). Bien que le noyau tétrazole diffère notablement de la structure

des autres azoles, son aromaticité est très élevée. De plus, certaines formes de l'anneau tétrazole surpassent l'aromaticité des di- et triazoles (**Bean, 1998**).

2.2. Acidité

Les tétrazoles 5-substitués ont une acidité comparable à celle des acides carboxyliques (**Butler, 1984**). Le remplacement isostérique du groupe $-CO_2H$ par un tétrazole réduit l'irritation gastrique tout en conservant l'activité anti-inflammatoire non-stéroïdienne. Les substituants en C-5 ont des effets semblables que ceux des acides carboxyliques, alors que les 5-aryl-tétrazoles sont des acides plus forts. En effet, L'augmentation de l'acidité est attribuée à une stabilisation par résonance accrue dans les anions-5-phényltétrazole par rapport au benzoate (**Butler, 1984**).

2.3. Solubilité

L'acétate d'Ethyle et le DMSO sont généralement les solvants organiques polaires solubilisant les tétrazoles 5-substitués. Dans les conditions basiques, les tétrazoles 5-substitués peuvent aisément être extraits dans la phase aqueuse sous forme de sel (**Benson, 1947**).

2.4. Autres propriétés des Tétrazoles

Les tétrazoles sont très réactifs du fait de la présence des doublets libres non-liants des différents azotes du noyau. La disponibilité des électrons π , leur permet d'être attaqués par divers réactifs électrophiles (**Butler, 1984 ; Ostrovskii, 2000**). De plus, ils peuvent exister sous deux tautomères lorsqu'ils contiennent une liaison NH libre (figure 2) (**Amigoni et al., 2004**).

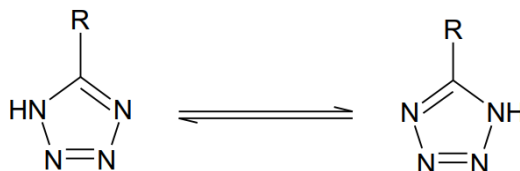


Figure 3 : Les deux formes tautomériques de tétrazoles 5-substitués

L'avantage majeur des tétrazoles est leurs résistances à plusieurs processus biologiques de dégradation.

3. Application des tétrazoles

3.1. Activités biologiques des tétrazoles

Le tétrazole non substitué ne présente pas d'activité pharmacologique, par contre le tétrazole substitué et ses dérivés sont présents dans de nombreux composés hétérocycliques bioactifs qui présentent un grand intérêt en raison de leurs diverses applications (**Mohite, 2011**).

a. Activité antibactérienne

Mosaad Sayed Mohamed *et al.*, (2009) ont rapporté la synthèse de N-(3-cyano-1-(3-méthylphényl)-4,5-diphényl-1H-pyrrol-2-yl)-acétamides (**Figure 4 5c**) et 2-amino-1-(4-méthoxyphényl)-4,5-diphényl-3-tétrazole-1H-pyrroles (**Figure 4 5d**). Ces deux composés ont montré une activité antimicrobienne puissante (**Figure 4a**). Une autre étude réalisée par Salahuddin, en 2009, montre que les benzo-thiéno [2, 3-d] pyrimidines, qui contiennent un cycle de tétrazole, sont plus actives contre les bactéries telles que *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilis*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* (**Figure 4b**).

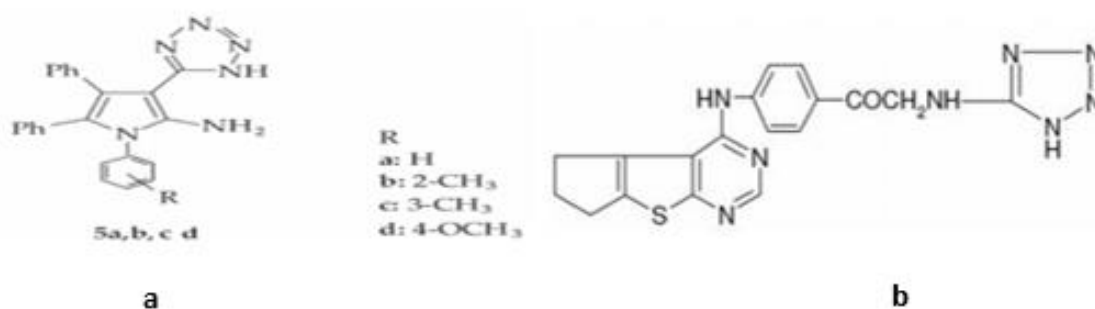


Figure 4 : Structure de deux tétrazole antibactériens

b. Activité antifongique

Une étude réalisée par Matysiak *et al.* (2003), montre que les tétrazoles sont plus actifs contre *Candida albicans* ATCC 1023 (**Figure 5**).

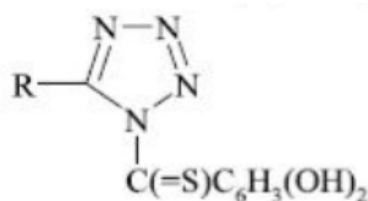


Figure 5 : structure de tétrazole antifongique

c. Activité antivirale

En 2005, Chang *et al.*, ont remarqué que l'addition de groupement tétrazolique au pyridyl-imidazolidinone améliore considérablement l'activité anti-EV71 (Entérovirus 71), ainsi qu'aucune toxicité cellulaire apparente n'a été observée pour ce composé (**figure 6a**).

Les travaux de Walker (2006) ont conduit à un nouveau chémotype à base de tri-cétoacide qui inhibe sélectivement la réaction de transfert de brin de l'intégrase du VIH, enzyme exprimée par le VIH, et qui représente une cible validée pour la thérapie (**figure 6b**).

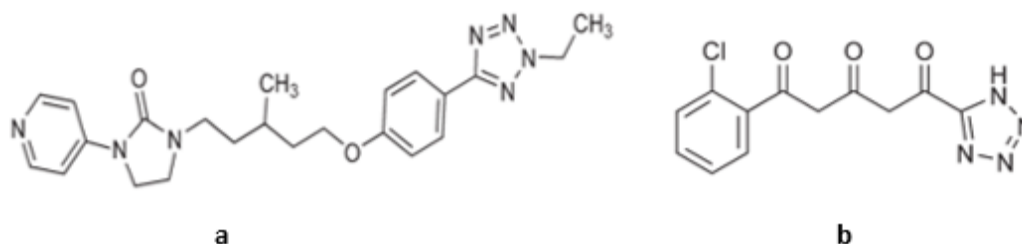


Figure 6 : Structure des tétrazoles Anti-EV71 (a) et anti-VIH (b).

d. Activité anti-cancéreuse

Dans le but d'évaluer l'activité anticancéreuse de certains dérivés de tétrazoles, différents dérivés contenant de l'isoxazole ont été synthétisés par l'équipe de Bhaskar (2010). Les résultats ont montré que le composé (1-[5-(2-chloro phényl) isoxazol-3-yl]-5-phényl-1H-tétrazole) est plus efficace et actif avec une influence sélective sur les lignées cellulaires du cancer de l'ovaire, en particulier sur SK-OV-3 avec un pourcentage de croissance de 34,94%.

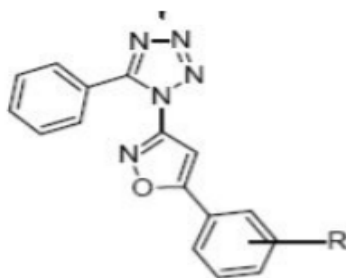


Figure 7 : Structure de tétrazole anticancéreux.

3.2. Applications pharmaceutique de tétrazoles et leurs dérivés

Les tétrazoles et leurs dérivés occupent une place importante dans le marché des médicaments (Kleemann, 1999). Exemples des médicaments à base des tétrazoles ou leurs dérivés :

- **Pentetrazol (Figure 8a)** : 6,7,8,9-Tétrahydro-5H-tétrazolo[1,5-a]azépine ; Analgésique, stimulant circulatoire.
- **Candesartan cilexetil (Figure 8b)** : Cyclohexyl [3-[2-ethoxy-3-[[4-[2-(5H-tétrazol-5-yl) phényl]phényl]méthyl]benzimidazol-4-yl]-1-méthyl-3-oxo-propyl] carbonate; Bloqueur de l'angiotensine II.

- **Ceftazole (Figure 8c)** : Sodium ; 8-oxo-7-[[2-(tétrazol-1-yl)acétyl]amino]-3(1,3,4thiadiazol-2-ylsulfanylméthyl)-5-thia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-ene-2-carboxylate; Antibiotique de la famille des céphalosporines.

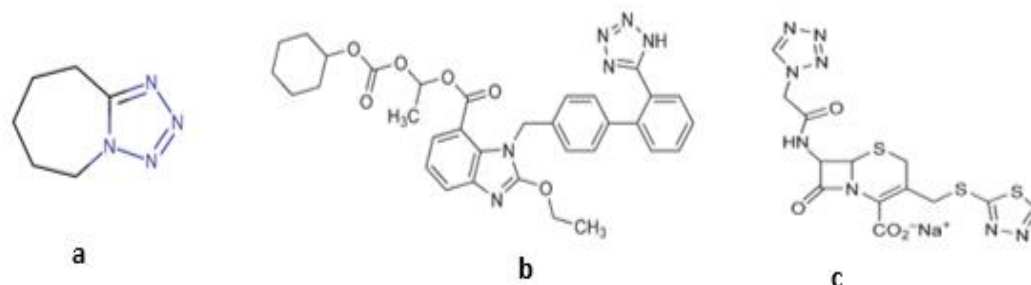


Figure 8 : Structure des tétrazoles présents dans les médicaments.

3.3. Autres applications des tétrazoles et leurs dérivés

Les tétrazoles ont d'autres fonctionnalités et applications soit en synthèses chimiques comme des réactifs de départ pour la désoxygénation des phénols (Cubero *et al.*, 1998) et la préparation des nitrilimines (Singh *et al.*, 1984), Soit en agriculture comme régulateurs de croissance des plantes ou comme des herbicides actifs (Roy et Lahiri, 1985 ; Reidalova *et al.*, 1988).

4. Synthèse des tétrazoles

4.1. Synthèse des tétrazoles à partir des nitriles et d'azide de sodium

Les tétrazoles sont généralement préparés par la réaction d'une source d'acide hydrazoïque avec un nitrile, dans un solvant inerte à des températures élevées. La cycloaddition 1,3-dipolaire, mettant en jeu un azoture, est l'une des meilleures méthodes de formation de tétrazoles. Une série d'aryl-tétrazole est obtenue en faisant réagir divers aryl-nitriles avec l'azoture de sodium en présence de $\text{FeCl}_3\text{-SiO}_2$ comme catalyseur et le DMF comme solvant (Figure 9) (Mahmoud *et al.*, 2009).

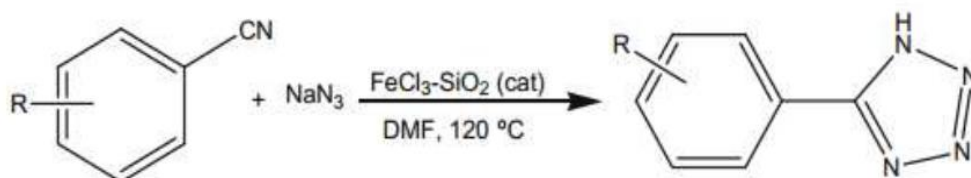


Figure 9 : Préparation de tétrazole à partir de nitrile et l'azoture de sodium.

Yoneyama *et al.*, (2013) ont développé une méthode efficace et accélérée qui permet la conversion des différents nitriles inactifs aux tétrazoles 5-substitués correspondants sous irradiation par micro-ondes dans le DMF (Figure 10).

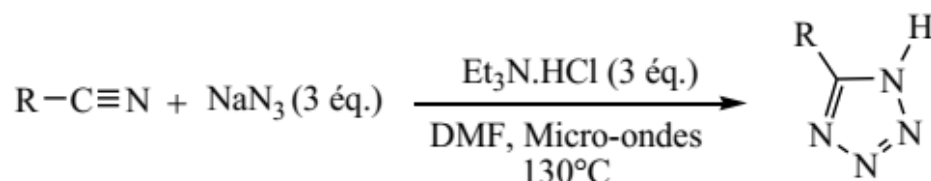


Figure 10 : Préparation de tétrazole à partir de nitrile et l'azoture de sodium sous irradiation.

4.2. Synthèse des tétrazoles à partir d'oxime.

Un protocole simple et efficace a été développé par Patil (2012) pour synthétiser le 1H-tétrazoles 5-substitués en réagissant divers oximes et de l'azoture de sodium (NaN_3) en utilisant l'acétate de cuivre comme catalyseur dans le DMF (Figure 11).

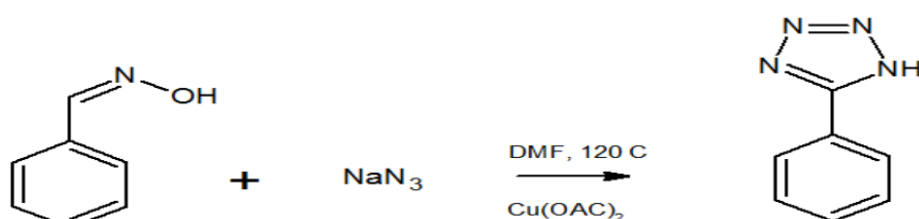


Figure 11 : Préparation de tétrazole à partir d'oxime

4.3. Synthèse des tétrazoles en présence d'acide de Lewis

En 1958, une étude de synthèse de tétrazole, en présence d'acides de Lewis a été réalisée par Finnegan (1958). Le mécanisme proposé implique une attaque nucléophile de l'ion azoture sur le carbone du groupe nitrile, suivie par la fermeture du cycle. L'utilisation de l'acide de Lewis (BF_3) augmente ou favorise la charge δ^+ sur le nitrile du carbone, ce qui augmente la vitesse de la réaction (Figure 12).

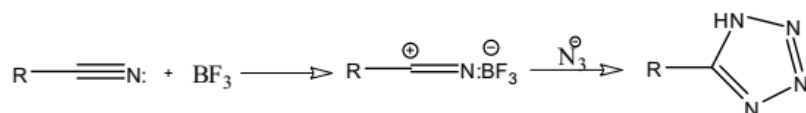


Figure 12 : Préparation de tétrazole en présence d'acide de Lewis.

4.4. Synthèse des tétrazoles par la Méthode de Sharpless : Approche du (click chemistry)

La «Click Chemistry» est une approche adaptable, faisant appel à des réactions pratiques et fiables avec des réactifs disponibles. Dans plusieurs cas, l'eau est le solvant idéal de réaction, donnant les meilleurs rendements et les plus élevés (Lewis, 2002). Ce terme a été introduit par

Kolb *et al.*, en 2001. L'un des exemples utilisant cette approche, étant la formation du 1,2,3-triazole à partir d'azides et des acétyléniques catalysée par le cuivre(I).

4.5. Synthèse des tétrazoles sans solvant.

Une nouvelle méthode de synthèse de 1H-tétrazoles 5-substitués a été développée par Shahnaz Rostamizadeh *et al.* (2009). C'est une réaction entre le nitrile et l'azoture de sodium en présence du chlorure de zinc (ZnCl_2) comme catalyseur. Les avantages de cette méthode par rapport aux autres méthodes rapportées dans la littérature sont : Des temps de réactions plus courts, catalyseur peu coûteux et respectueux de l'environnement, l'utilisation de produits commerciaux disponibles, Absence de solvant et donne des rendements élevés (**Figure 13**).

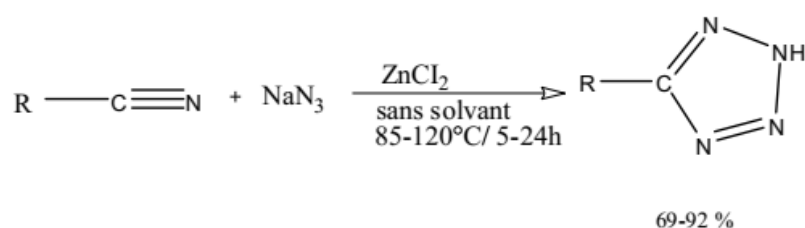


Figure 13 : Préparation de tétrazole en présence de chlorure de zinc (ZnCl_2) sans solvant.

D'autres méthodes utilisent le Fluorure de tétrabutylammonium (TBAF) comme catalyseur pour la réaction de cycloaddition [3+2] du nitrile organique et l'azide en absence du solvant. Cette méthode a de bon rendement allant de 80 à 97% (Figure 14) (**Amantini et al., 2004**).

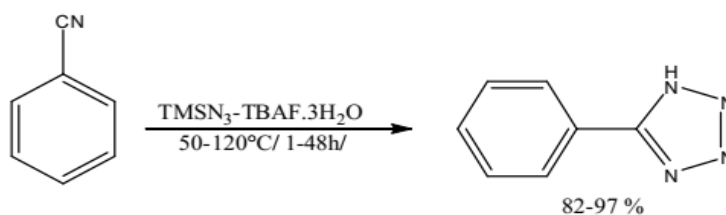


Figure 14 : Préparation de tétrazoles par l'azoture de triméthylsilyle sans solvant.

II. Généralités sur la microflore de l'environnement hospitalier

De nombreux micro-organismes, notamment les bactéries, colonisent l'environnement hospitalier. Ce dernier contient les bactéries commensales constituant la flore normale des patients. Cette flore joue un rôle dans la protection contre les microorganismes. En plus, l'environnement hospitalier contient aussi des bactéries pathogènes multirésistantes responsables des infections nosocomiales.

2.1. *Escherichia coli*

C'est en 1885 que la bactérie *Escherichia coli* est décrite pour la première fois dans des selles de nourrissons, par l'Allemand Theodor Escherich. Toutefois, son nom actuel lui est donné en 1919 par Castellani et Chambers (**Castellani, 1919**).

Escherichia coli ou colibacille est une entérobactérie à Gram négatif, mesurant 2 à 4 μm de longueur sur 0,4 à 0,6 μm de largeur, fine, allongée à extrémités arrondies et mobile grâce à une ciliature péritriche.

Les principaux caractères qui distinguent *E. coli* des autres entérobactéries sont : la fermentation du lactose, la production d'une β -galactosidase, la production d'indole à partir du tryptophane, l'absence d'uréase et l'absence d'utilisation du citrate (Simmons) comme source d'énergie et de carbone. Concernant l'habitat, on trouve *Escherichia coli* en abondance dans la flore commensale, en particulier dans le tube digestif. Par ailleurs, elle est très répandue dans l'environnement : eau, sols, et dans les aliments (**Baraduc et al., 2000**).

Escherichia coli pousse facilement sur les milieux ordinaires en 24h à 37°C en aérobose et en anaérobose. Ces exigences nutritionnelles sont en général réduites et la bactérie se multiplie en milieu synthétique avec le glucose comme source de carbone simple. (**Farmer et al., 2007**). Sur milieu gélosé les colonies sont lisses, brillantes, de structure homogène. *E. coli* possède une catalase mais dépourvu d'oxydase (**Le Minor et al., 1990**).

Bien que la majorité des souches de *E. coli* soient commensales banales, certaines d'entre elles sont pathogènes et à l'origine de pathologies intestinales (**Levine, 1987**) ou extra-intestinales (**Pohl, 1993**). Chez l'homme, la colonisation par *E. coli* est précoce, et peut être responsable d'un nombre varié de pathologie. Toutefois, trois types de syndromes majeurs résultent de l'infection par des souches *E. coli* pathogènes : infections urinaires (impliqué dans 80 % des infections urinaires), les infections digestives (diarrhées, infections hépatobiliaires et autres), et les méningites néonatales et septicémies (**Jaureguy, 2009**).

2.2. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa est anciennement appelé *bacille pyocyanique* du fait de sa capacité à donner un pigment de couleur bleu-vert qui donne à la colonie sa couleur caractéristique. C'est une bactérie ubiquitaire dans l'environnement. C'est un bacille à Gram négatif, aérobic strict non sporulé, en forme de bâtonnet ces bacilles sont très mobiles grâce à des flagelles polaires uniques. Il est capable de pousser jusqu'à une température de 42°C. Il sécrète un certain nombre de composés qui vont augmenter sa virulence et sa pathogénicité (Sunil, 2010) notamment :

- Des enzymes extracellulaires qui peuvent détruire l'intégrité des tissus de l'hôte en dégradant des protéines telles que l'élastine, le collagène et les transférines (Wan *et al.*, 2010).
- La pyocyanine, un pigment soluble bleu-vert, est une toxine de faible poids moléculaire qui peut facilement traverser les membranes biologiques et affecter différentes fonctions dans la cellule hôte, telles que l'inhibition de la respiration cellulaire, de la fonction ciliaire ou de la croissance des cellules épidermiques (Mekuskiene, 2003). Le *Pseudomonas* est pathogène, très résistant et responsable d'infections nosocomiales telles que : la pneumonie, les infections urinaires, les infections d'appareil respiratoire et les infections des brûlures graves (Mickevicius *et al.*, 2009). C'est l'une des bactéries les plus difficiles à traiter cliniquement et très résistantes aux antibiotiques.

2.3. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus est une bactérie de type cocci Gram positif, non capsulée, très résistante dans le milieu extérieur et peu exigeante en culture. C'est un germe ubiquitaire et commensal présent en faible quantité dans le tube digestif et parfois au niveau de la fosse nasale d'individus sains, à la surface de la peau (mains) ou dans les zones humides (aisselles, périnée). La plupart des souches de *S. aureus* élaborent un pigment qui donne une couleur jaune-orangé aux colonies, d'où le nom de staphylocoque doré. Cette dernière est connue pour provoquer des infections de la peau : furoncles, folliculites, panaris, impétigo. Elles peuvent aussi atteindre les yeux (conjonctivites), les oreilles (otites) ou les voies respiratoires (pneumonies, pleurésies).

Les Staphylocoques partagent avec la bactérie *Escherichia coli* le premier rang des germes responsables d'infections nosocomiales et des toxi-infections alimentaires (Ishankhodzhaeva, 2001).

2.4. *Streptococcus spp*

Les streptocoques sont des bactéries à Gram positif sphériques de 0,5 à 1 μm de diamètre, non mobiles, non sporulés. Ces dernières forment, en milieux liquide, des chaînettes caractéristiques. Ce sont des germes aéro-anaérobies facultatifs qui prolifèrent sur des milieux riches. Ce sont des bactéries fragiles, généralement parasites des muqueuses en particulier buccales, digestives et rhinopharyngées.

Les streptocoques sont classés selon leur hémolyse, en trois classes : les α -hémolytiques, β -hémolytiques et les γ -hémolytiques, et pour certaines espèces selon la présence d'antigène spécifique de leur paroi. L'hémolyse est due à des enzymes appelées « hémolysines » capables de lyser les érythrocytes présents dans la gélose au sang. Les streptocoques β -hémolytiques sont groupés selon les antigènes polysaccharidiques, qu'ils possèdent sur leur paroi, appelés les groupes sérologiques de Lancefield. On distingue 18 groupes sérotypiques (A \rightarrow H et K \rightarrow T).

Parmi les groupes de streptocoques β -hémolytiques les espèces suivantes sont les plus pathogènes : **A** : *Streptococcus pyogenes*, **B** : *Streptococcus agalactiae*, **C ou G** : *Streptococcus dysgalactiae*. Les *Streptococcus pneumoniae* sont à l'origine de nombreuses pneumonies mortelles, ou des méningites. Les *Streptococcus pyogenes* causent des angines, abcès, scarlatine ou fasciite nécrosante, et peuvent aussi évoluer si l'infection est mal traitée. Certaines souches de *Streptococcus pneumoniae* deviennent de plus en plus résistantes à l'action de la pénicilline. Cette résistance est maintenant répandue et augmente rapidement partout dans le monde (Appelbaum, 1992).

2.5. *Bacillus subtilis*

C'est un Bacille à Gram positif, mobile par des cils péritriches, capsulé, en forme de bâtonnets de 2 μm de diamètre et dont la longueur peut atteindre 7 μm , formant des spores ellipsoïdales ou cylindriques en position centrale, paracentrale ou subterminales dans le corps bactérien. Les colonies sont larges (2 à 4 mm), leur morphologie est variable entre les différentes souches et parfois dans la même souche ce qui donne un aspect de culture mixte. Il est capable de pousser en milieux salés simples en présence d'ammonium, urée ou acides aminés tel l'arginine, glutamine, glutamate, asparagine ou l'aspartate comme source d'azote, de glucose ou autres sucres simples comme source de carbone, et de phosphate comme source de phosphore (Piggot, 2009). C'est une bactérie aérobie pouvant se développer en anaérobiose par fermentation en présence de nitrate comme accepteur final d'électrons (Nakano *et al.*, 1997).

Les *bacillus* peuvent provoquer l'activation de virulence chez les espèces pathogènes, ou la formation de biofilms.

L'infection à *B. subtilis* survient surtout en milieu hospitalier chez certains patients immunodéprimés ou dans des cas de septicémie récurrente à *B. subtilis* (**Oggioni, 1998**).

III. Résistance aux antibiotiques et aux désinfectants

La sélection de bactéries résistantes aux antibiotiques est due à l'usage généralisé des antibiotiques et à la forte adaptabilité des souches bactériennes à cause des mutations chromosomiques en sélectionnant des mutants résistants au sein d'une population bactérienne ou par transfert des gènes de résistances (**Goossens et al., 2006**) qui peut s'effectuer au sein d'une même espèce ou d'une espèce bactérienne à l'autre (**Noble et al., 1992 ; Alekshun et Levy, 2007**).

Les bactéries ont développé plusieurs mécanismes de résistance pour échapper à l'action létale des antibiotiques notamment :

- ✓ la modification de la perméabilité qui ne se rencontre que chez les bactéries Gram négatif.
- ✓ Modification de l'antibiotique, c'est le cas d'*E. coli* résistante à l'ampicilline par l'expression de TEM-1 β - lactamase modifiant l'ampicilline (**Rice et al., 2003**).
- ✓ Modification de la cible, c'est le cas des *Staphylococcus* résistants à la méticilline (SARM) par modification des PLPs (Protéines Liant les Pénicillines), La modification des PLPs semble être le mécanisme principal de résistance aux β -lactamines chez les bactéries Gram positif (**Walsh, 2003**).
- ✓ Augmentation du flux de sortie (systèmes d'efflux), c'est le cas de la résistance aux tétracyclines (antibiotique agissant sur la sous-unité 30S des ribosomes) qui est due à la sortie active de l'antibiotique à travers la membrane plasmique (**Markham et Neyfakh, 2001**).

La résistance des bactéries aux désinfectants était principalement liée à la composition de la membrane cytoplasmique qui est à la fois un obstacle physique et chimique. Cette résistance varie donc selon le type de bactérie. La fréquence des résistances acquises aux désinfectants est nettement moins importante que la résistance aux antibiotiques (**Russel, 1997**). Cette forme de résistance risque de se développer tout particulièrement lorsque les organismes sont exposés fréquemment à des concentrations inférieures ou proches de la concentration recommandée.

Les bactéries résistent aux désinfectants par plusieurs mécanismes :

- ✓ Production de nouvelles enzymes résistantes.
- ✓ Changement dans la structure interne de la cellule.
- ✓ Modification de la perméabilité de la membrane cytoplasmique.
- ✓ Modification de la structure de la paroi cellulaire.

Une étude réalisé par Joly en 1996 a montré que les bactéries *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus ssp.*, *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* sont résistantes à l'ammonium quaternaire. Alors que *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella sp.*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* sont résistantes à l'action des phénols (**Joly, 1996**).

Il est donc essentiel de respecter exactement les conditions d'utilisation des produits de désinfection (Concentrations et mode d'emploi) afin d'éviter l'émergence des souches résistantes.



*Partie Matériels et
Méthodes*

I. Présentation de l'étude

Cette étude a été réalisée au sein de Laboratoire de Biotechnologie à la Faculté des Sciences Dhar El Mahraz de Fès entre le 20 Janvier et le 30 Mai 2018. Elle a été consacrée à l'évaluation de l'activité antibactérienne de deux molécules chimiques synthétiques dérivées de tétrazoles.

II. Matériels

Nous avons mené notre étude sur différents types de souches bactériennes.

- Des souches de **Références ATCC** :
 - ✓ *Esherichia coli* ATCC 25922 (*E. coli* R),
 - ✓ *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (*S. aureus* R),
 - ✓ *Bacillus subtilis* ATCC 3366 (*B. subtilis* R),
 - ✓ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (*P. aeruginosa* R)
- Des souches isolées de l'environnement **Hospitalier** (service de soins intensifs) d'un hôpital public à vocation provinciale de la ville de Fès, les souches ont été identifiées par notre équipe (**Bekkari et al., 2016**) :
 - ✓ *Esherichia coli* (*E. coli* H)
 - ✓ *Staphylococcus aureus* (*S. aureus* H).
- Des souches isolées, des **Aliments** destinés aux patients au CHU Hassan II, purifiées et conservées à -80°C au sein du Laboratoire de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Fès :
 - ✓ *Esherichia coli* (*E. coli* A)
 - ✓ *Staphylococcus aureus* (*S. aureus* A)
 - ✓ *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa* A)
 - ✓ *Streptococcus spp* (*Streptococcus* A)

❖ Dérivés de tétrazoles

Nous nous sommes intéressés à l'étude de l'activité antibactérienne de deux produits chimiques dérivés de tétrazoles synthétisés au sein du laboratoire de chimie organique à la faculté des sciences Dhar El Mahraz à Fès.

Nature et synthèse des produits chimiques testés

Les deux composés organiques synthétisés sont le tétrazole substitué en position 5 par un groupement électroattracteur le (5-(thiophén-2-yl)-1H-tétrazole) (TET) dénommé SB13 et l'oxime de thiophène 2-carbaldéhyde dénommé SB9 (**Alami et al., 1996**). Le schéma réactionnel suivant résume les étapes de cette synthèse (Figure 15).

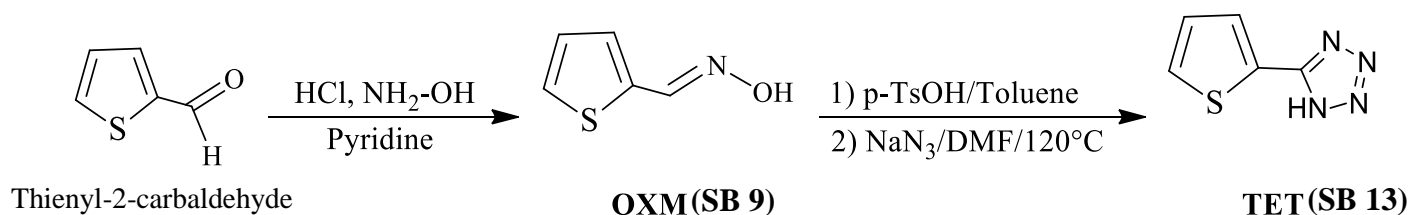


Figure 15 : Etapes de synthèse des produits OXM (SB9) et TET (SB13)

III. Evaluation de l'activité antibactérienne des dérivés des tétrazoles

L'évaluation de l'activité antibactérienne d'une molécule synthétique chimique est réalisée en deux tests :

- ❖ **Méthode qualitative** : C'est un test qui permet la mise en évidence de l'activité antibactérienne.
- ❖ **Méthode quantitative** : C'est un test qui permet de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB) pouvant inhiber la croissance des bactéries testées.

3.1.Méthode de diffusion en milieu solide : Antibiogramme

L'antibiogramme ou la méthode de diffusion est l'une des plus anciennes approches de détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques et demeure l'une des méthodes les plus utilisées en routine dans les laboratoires d'analyse médicale. Il est recommandé par le comité Européenne des tests de susceptibilité antibactérienne (**EUCAST, 2015**) et le comité national des standards cliniques de laboratoire (**CLSI, 2012**).

3.1.1.Principe

Cette méthode consiste à déposer un disque imbibé de l'agent antibactérien dans une boîte de pétri préalablementensemencée par une espèce bactérienne. La diffusion de l'agent antibactérien dans la gélose crée un halo d'inhibition de croissance de la bactérie autour du disque. La sensibilité des souches bactériennes aux produits testés pourrait être classée en trois profils selon le diamètre d'halo d'inhibition (**Demirbas, 2004**) :

- ✓ Hautement active : zone d'inhibition > 12mm
- ✓ Modérément active : zone d'inhibition de 6-11 mm
- ✓ Faiblement active : zone d'inhibition de <5 mm

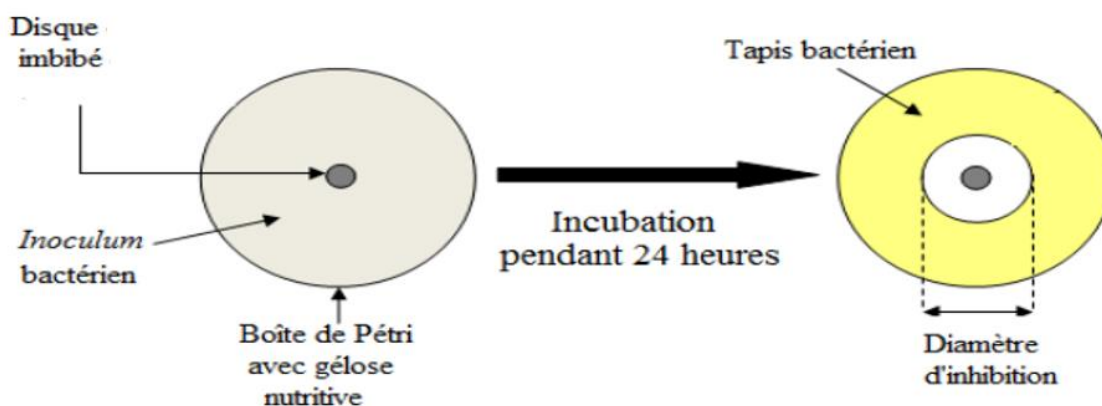


Figure 16 : Principe de la méthode de diffusion sur disque : Antibiogramme

3.1.2. Protocol expérimental

L'activité antibactérienne par diffusion sur disques des produits chimiques synthétiques testés, SB9 et SB 13, a été réalisée selon le Protocol recommandé par l'EUCAST et CLSI, avec quelques modifications (EUCAST, 2015 ; CLSI, 2012).

a. Préparation des solutions mère des dérivés de tétrazoles

Une quantité de 15 mg des produits chimiques, SB9 et SB 13, a été solubilisée dans 60 μ l de DMSO pour obtenir une concentration finale de 250mg/ml.

b. Préparation de l'inoculum

A partir d'une culture bactérienne pure de 24 heures sur milieu LB (Annexe 1), 3 à 4 colonies ont été prélevées à l'aide d'une anse puis transférées dans 5ml du milieu LB afin de préparer une suspension bactérienne. Cette dernière a été homogénéisée. La turbidité de la suspension bactérienne a été ajustée à une DO=0,1 à 600 nm, équivalent à celle du standard McFarland 0.5 et qui correspond un inoculum d'une charge bactérienne de 10^8 UFC/ml (CLSI, 2012) (Annexe 2).

c. Inoculation des boîtes

L'inoculation a été réalisée par la méthode d'écouvillonnage sur des boîtes contenant le milieu LB. Un écouvillon en coton stérile a été plongé dans la suspension bactérienne. L'excès de liquide a été éliminé en tournant l'écouvillon sur les parois du tube.

d. Dépôt des disques

Les disques de papier Whatman, N°1 de 6 mm de diamètre, préalablement stérilisés (préparés et autoclavés pendant 20 minutes à 121°C) ont été déposés à la surface de géloseensemencée avec les souches bactériennes à testées. 10 μ l des solutions de SB 9 ou SB 13 ont

été déposés sur les disques. 10µl d'Ampicilline (100 µg/ml) ont été déposés sur des disques utilisés comme témoins positifs. Le témoin négatif est un disque contenant 10µl de DMSO. Les boîtes sont incubées à 37 °C pendant 24 heures. Chaque essai a été réalisé en deux répétitions.

Après 24 heures d'incubation, le produit doté d'une activité antibactérienne forme un halo d'inhibition autour du disque. Les diamètres d'inhibition ont été mesurés en (mm). Le Diamètre de disque est exclu.

3.2.Détermination des concentrations minimales inhibitrices et bactéricides

L'action de l'agent antibactérien sur une souche bactérienne peut être caractérisée sa concentration minimale inhibitrice (CMI) et sa concentration minimale bactéricide (CMB).

3.2.1.Détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI en milieu liquide

La CMI est définie selon le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) comme étant la plus faible concentration qui entraîne l'inhibition de la croissance bactérienne visible (EUCAST, 2015).

a. Principe

La détermination de la CMI a été réalisée par la préparation d'une série de dilutions de 1/2 de l'agent antimicrobien à tester sur milieu liquide (microdilution ou macrodilution). La CMI est la plus faible concentration de l'agent antibactérien présent dans le tube, le puit ou la boîte qui ne présente aucune croissance bactérienne visible (CLSI, 2012).

b. Protocol expérimental

b.1) Préparation des solutions mère des produits chimiques

Une quantité de 15 mg de produit SB 9 ou SB 13 a été solubilisés dans 0.5ml du milieu LB auquel additionné à 0.2 ml de DMSO, 2.3 ml du milieu LB ont été ajoutés pour avoir une concentration finale de 5 mg/ml.

Au cours de ce travail la CMI a été déterminée par la méthode de dilution en milieu liquide par macrodilution et microdilution

b.2) Méthode de dilution en milieu liquide : Macrodilution

La méthode de macrodilution consiste à préparer des séries de dilution dans des tubes à essai avec un volume final de 1ml (CLSI, 2012). La détermination de la CMI des produits chimiques synthétiques SB9 et SB13 par macrodilution est réalisée selon le protocole recommandé par CLSI (CLSI ,2012 ; Sudhakar Babu *et al.*, 2012), avec quelques modifications.

i. Préparation de l'inoculum

A partir d'une culture bactérienne pure de 24 heures sur milieu LB des souches testées, une préculture de 3-4 heures a été réalisée en prélevant 3 à 4 colonies à l'aide d'une anse puis transférées dans 5ml du milieu LB afin de préparer une suspension bactérienne. La turbidité de cette dernière a été ajustée à une $DO=0,1$ à 600 nm, équivalent à celle du standard McFarland 0.5 et qui correspond à un inoculum d'une charge bactérienne de 10^8 UFC/ml. Ensuite, 5ml de l'inoculum des souches testées ont été préparés en ajoutant 4,950 ml de milieu LB et 50 μ l de la suspension bactérienne afin de diluer la charge bactérienne de 1/100 pour avoir une concentration finale de 10^6 UFC/ml.

ii. Préparation de la série de dilution des produits SB9 et SB13

250 μ l du milieu LB ont été distribués dans des tubes à essai stériles. Ensuite 500 μ l des solutions mère de SB9 ou SB13 ont été ajoutés dans le premier tube. Après agitation, une série de dilution en cascade a été réalisée par ajout de 250 μ l de la solution du premier tube au deuxième et ainsi de suite jusqu'au dernier tube où 250 μ l ont été éliminés pour avoir le même volume dans tous les tubes. Les concentrations obtenues vont de 2.5 mg/ml à 0,07 mg/ml pour les deux produits SB 9 et SB 13.

250 μ l de l'inoculum bactérien, a été ajouté dans les tubes contenant la série de dilution. Le volume final dans les tubes est de 0.5ml, et la charge bactérienne est de 5×10^5 UFC/ml. Les concentrations finales des produits testés varient de 2.5 mg/ml à 0,07 mg/ml pour SB 9 et SB13.

Un tube témoin négatif a été réalisé, il contient l'inoculum bactérien à 5×10^5 UFC/ml. Tous les tubes ont été incubés à 37°C pendant 24 heures.

La CMI correspond au tube contenant la plus faible concentration du produit testé qui n'a montré aucune croissance bactérienne visible.

b.3) Méthode de dilution en milieu liquide : Microdilution

La méthode de microdilution consiste à préparer des séries de dilution dans une microplaque de polypropylène à 96 puits. La détermination de la CMI par microdilution a été réalisée selon le protocole recommandé par CLSI (CLSI, 2012 ; Hellal *et al.*, 2015).

i. Préparation de l'inoculum

La préparation de l'inoculum a été réalisée comme décrit ci-dessus pour la macrodilution sauf au lieu de préparer 5ml de l'inoculum nous avons préparé 2 ml (Cf. matériel et méthodes, III- 3.2- b.2)- i. Préparation de l'inoculum).

ii. Préparation de la série de dilution des produits SB9 et SB13

100 μ l du milieu LB ont été distribués dans tous les puits à l'exception de ceux de la première ligne. Puis, 200 μ l des solutions mère des produits SB9 ou SB13 ont été ajoutés dans

la première ligne. La réalisation des séries de dilution a été faite en prélevant 100µl du premier puit de la première colonne et en l'ajoutant dans le deuxième puit appartenant à la même colonne, et ainsi de suite jusqu'à l'avant dernier puit. Les mêmes étapes ont été répétées pour les autres colonnes. Les puits ont été inoculés par 100µl de la suspension bactérienne avec une concentration de 10^6 UFC/ml. Les puits de la dernière ligne de la microplaque ne contiennent que l'inoculum (témoin).

La microplaque a été incubée à 37°C pendant 24 heures. La CMI correspond au puit, contenant la plus faible concentration du produit testé, qui n'a montré aucune croissance bactérienne visible.

3.2.2. Détermination de la concentration minimale bactéricide CMB en milieu solide

La CMB correspond à la plus faible concentration du produit testé capable de tuer 99.9% des bactéries et de ne laisser pousser que 0,01% (**Delarras, 1998**).

❖ Protocol

A partir des tubes et des puits utilisés pour la détermination de la CMI, 5µl de chaque tube ou puit ont été déposés sur milieu LB, puis étalés par stries et incubés à 37 °C pendant 24 heures. La CMB a été considérée comme étant la plus faible concentration, en produit testé, ayant montré une absence de croissance (**Hellal et al., 2015**).

Le calcul du ratio CMB/CMI permet d'évaluer si un agent antibactérien a un effet bactéricide ($CMB/CMI \leq 4$) ou bactériostatique ($CMB/CMI > 4$) (**Berche et al., 1988; Gatsing et al., 2009**).

IV. Analyse et traitement des données

Le calcul des moyennes et des écarts types a été élaboré à l'aide du programme Excel.



*Partie Résultats et
Discussion*

I. Evaluation de la sensibilité des bactéries aux produits chimiques par diffusion sur disque.

Les dérivés de tétrazoles ont une grande importance comme agents antibactériens. Notre étude a porté sur l'évaluation de l'activité antibactérienne des composés synthétiques SB 9 et SB 13 vis-à-vis de quatre souches de référence ATCC (*E.coli R*, *S.aureus R*, *B.subtilis R*, *P.aeruginosa R*) et sur six souches isolées à partir de l'environnement hospitalier (*E.coli A*, *E.coli H*, *S.aureus H*, *S.aureus A*, *P.aeruginosa A* et *Streptococcus spp A*). La sensibilité de ces souches est évaluée par la méthode de diffusion sur disque.

1.1.Mise en évidence de l'activité antibactérienne contre les souches ATCC

Le tableau 1 représente les résultats des diamètres des auréoles d'inhibition de la croissance des souches ATCC par les deux produits SB 9 et SB 13 (exprimés en mm).

Le produit SB 9 a une activité inhibitrice sur les bactéries à Gram négatif ; *E.coli R* et *P.aeruginosa R* avec un diamètre d'halo d'inhibition de 9 et 12 mm respectivement et a une activité inhibitrice faible sur les Gram positif *S.aureus R* et *B.subtilis R* (2 mm) (Tableau 1).

Ces résultats corroborent avec les travaux de Dhayanithi *et al.* (2010) sur des dérivés de tétrazoles, contenant le groupement pipérazine, qui montrent une activité inhibitrice sur *E.coli* (8-10 mm) et sur *P.aeruginosa* (7-12 mm).

Le produit SB 13 est très actif sur *P.aeruginosa R* (12.5 mm), modérément actif sur *S.aureus R* (7.5 mm) et *B.subtilis R* (6.5 mm) et faiblement actif sur *E.coli R* (4.5 mm) (Tableau 1).

Des résultats similaires sont obtenus par de nombreux travaux notamment ceux réalisés par B. Mohite (2010) avec des 5-phényl-tétrazoles et Kategaonkar *et al.*, (2010) avec des tétrazoles[1, 5-a] quinolines. En effet, Ces composés ont provoqué une inhibition des souches *E.coli*, *S.aureus* et *B.subtilis* avec des diamètres d'inhibition de 5, 7 et 6-9 mm respectivement. Des dérivés des tétrazoles substitués par le groupement benzyl ont une activité inhibitrice sur *P.aeruginosa* avec un halo d'inhibition de 13 mm (**Dhayanithi *et al.*, 2011**). Les effets de nos produits sur *P.aeruginosa* sont prometteurs par rapport à celles obtenus par Yildirim *et al.*, (2009) avec des phénylsélanyl-1-(toluène-4-sulfonyl)-1H-tétrazole auxquelles *P.aeruginosa* s'est révélée résistante.

Tableau 1 : Diamètres des halos d'inhibition (en mm) du SB 9 et SB 13 contre les souches ATCC.

Souches ATCC	SB9	SB13	Ampicilline*
<i>E.coli R</i>	9±1.4	4,5±0.7	23,5±1
<i>S.aureus R</i>	2±0	7,5±0.3	21±0.7
<i>B.subtilis R</i>	2±0	6,5±0.3	42±1.4
<i>P.aeruginosa R</i>	12±2.8	12,5±1.1	23,5±1

***Témoin positif** : Ampicilline (100µg/ml)

1.2.Mise en évidence de l'activité antibactérienne contre les souches d'origine hospitalière.

Le tableau 2 représente les résultats des diamètres des auréoles d'inhibition de SB 9 et SB 13 sur les souches d'origine hospitalière.

Le test de sensibilité au produit SB9 des différentes souches d'origine hospitalier, a montré une forte activité inhibitrice sur *E.coli H* et *P.aeruginosa A* (14.5 et 14 mm respectivement) et une activité modérée sur *S.aureus A* et *Streptococcus spp A* (7 et 6.5 mm respectivement). Par-contre les souches bactériennes *E.coli A* et *S.aureus H* se sont montrés résistantes (4.5 mm).

Le produit SB 13 a une forte activité inhibitrice sur *S.aureus H* (8.5mm) et une activité inhibitrice modérée sur *E.coli H* et *S.aureus A* (7mm). Cependant, cette activité inhibitrice est faible sur *E.coli A*, *P.aeruginosa A* et *Streptococcus A* avec des diamètres d'inhibition de 5, 4.5 et 5.5 mm respectivement (Tableau 2).

Tableau 2 : Diamètres des halos d'inhibition (en mm) du SB 9 et SB 13 contre les souches d'origine hospitalière.

Souches d'origine Hospitalière	SB9	SB13	Ampicilline*
<i>E.coli A</i>	4.5±0.71	5±0	6±1.4
<i>E.coli H</i>	14,5±0.71	7±1.41	14.5±0.71
<i>S.aureus H</i>	4.5±0.71	8,5±0.71	25.5±1
<i>S.aureus A</i>	6,5±0.71	7±0	26±0.71
<i>P.aeruginosa A</i>	14±1.41	4.5±0.71	5±0
<i>Streptococcus A</i>	7±0	5,5±0.71	11±0

***Témoin positif** : Ampicilline (100µg/ml).

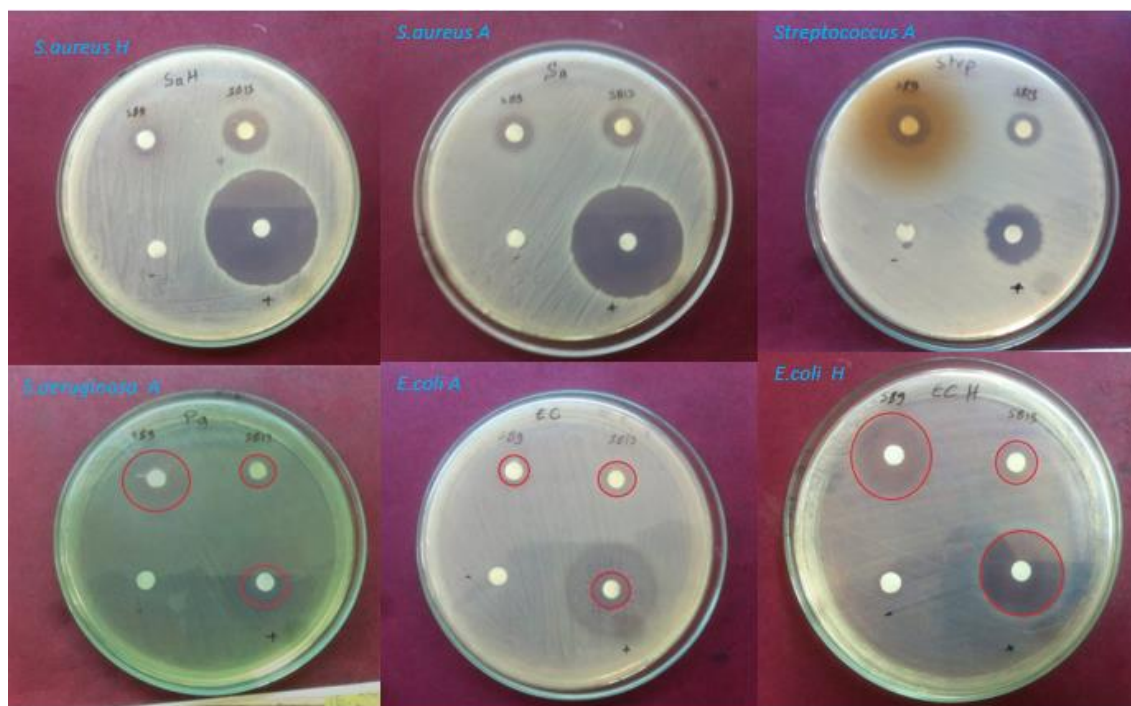


Figure 17 : Expression de l'activité des deux produits SB 9 et SB 13 sur des souches bactériennes testées.

A notre connaissance, il n'existe pas beaucoup de travaux déjà réalisés sur l'activité antimicrobienne des dérivés de tétrazoles sur les souches d'origine hospitalier sauf une étude qui a été réalisé par **Morjan et al.,(2015)** sur des dérivés 5-oxo et 5-thio-tétrazoles 1,4-disubstitués. Les résultats de cette étude montrent que certains dérivés 5-oxo-tétrazoles ont des activités sur les souches *E.coli*, *Streptococcus spp* et *S.aureus* avec des halos d'inhibition de 5 mm, 5-6mm et 6mm respectivement. Ces dérivés 5-oxo-tétrazoles sont non actifs sur *P.aeruginosa*, alors que d'autres dérivés 5-thio tétrazoles sont très actifs sur *P.aeruginosa*, *S.aureus*, *E.coli* et *Streptococcus spp*.

Toutes les souches de références sont très sensibles à l'ampicilline avec des halos d'inhibitions compris entre 23.5mm et 42 mm. Par contre *E.coli A* et *P.aeruginosa A* ont été révélées plus résistantes à l'ampicilline avec des diamètres d'inhibitions ≤ 6 mm.

Cette divergence dans les résultats explique le rôle que peuvent jouer les facteurs environnementaux sur l'acquisition de la résistance par les bactéries contre un agent antibactérien que ce soit antibiotique ou composé tétrazolique. Ainsi que le rôle des substituants ou les radicaux liés au cycle tétrazole sur l'activité antibactérienne et qui peuvent modifier les propriétés chimiques des dérivés des tétrazoles (hydrophobicité...), en influençant sur le mode d'action.

II. Détermination des concentrations minimales inhibitrice CMI

Les tableaux 3, 4, 5 et 6 représentent les concentrations minimales inhibitrices des produits dérivés de tétrazoles SB 9 et SB 13 contre les souches de références ATCC (*E.coli R*, *S.aureus R*, *B.subtilis R* et *P.aeruginosa R*) et les souches isolées à partir d'environnement hospitalier (*E.coli A*, *E.coli H*, *S.aureus A*, *S.aureus H*, *P.aeruginosa A* et *Streptococcus spp A*). La CMI correspond à la plus faible concentration n'ayant montré aucune croissance bactérienne visible.

2.1. Concentrations minimales inhibitrice contre les souches de références ATCC.

Les tableaux 3 et 4 montrent que SB 9 et SB 13 ont une activité antibactérienne sur les souches ATCC et confirment les résultats de test qualitatif. En effet, SB 9 inhibe la croissance de la souche *P.aeruginosa R* à une CMI de 0.62 mg/ml, la souche *E.coli R* à une CMI de 1.25mg/ml et des souches *S.aureus R* et *B.subtilis R* à une CMI de 2.5mg/ml (Tableau3).

Tableau 3 : Concentrations minimales inhibitrices (mg/ml) du SB9 sur les souches ATCC.

Concentration Souches (mg/ml)	2.5	1.25	0.625	0.31	0.15	0.07	Témoin
<i>E.coli R</i>	-	-	+	+	+	+	+
<i>S.aureus R</i>	-	+	+	+	+	+	+
<i>B.subtilis R</i>	-	+	+	+	+	+	+
<i>P.aeruginosa R</i>	-	-	-	+	+	+	+

Quant au produit SB13, il inhibe la croissance de toutes les souches ATCC avec une CMI de 1.25mg/ml à l'exception de *P.aeruginosa A* qui est inhibé à une CMI de 0.62mg/ml (Tableau 4).

Tableau 4 : Concentrations minimales inhibitrices (mg/ml) du SB 13 sur les souches ATCC.

Concentration Souches (mg/ml)	2.5	1.25	0.625	0.31	0.15	0.07	Témoin
<i>E.coli R</i>	-	-	+	+	+	+	+
<i>S.aureus R</i>	-	-	+	+	+	+	+
<i>B.subtilis R</i>	-	-	+	+	+	+	+
<i>P.aeruginosa R</i>	-	-	-	+	+	+	+

Dans la littérature, les résultats des CMI des dérivés de tétrazoles sont très variables, elles sont de l'ordre de µg à l'ordre de mg. En effet, les études de Dhayanithi *et al.* (2010) réalisées

sur des dérivés de tétrazoles, montrent que les souches *E. coli* et *S. aureus* ont été inhibées avec une CMI de 6.25 mg/ml et *P.aeruginosa* a été inhibé avec une CMI de 50mg/ml. Dans une deuxième étude réalisée avec d'autres dérivés des tétrazoles, les mêmes auteurs ont trouvé que ces produits inhibent les souches *S. aureus*, *E. coli* et *P. aeruginosa* avec une CMI de l'ordre de 12.5 mg/ml (Dhayanithi *et al.*, 2011). D'autres études ont montré que les valeurs de CMI des dérivés de tétrazoles sur *E.coli*, *B. subtilis*, *S.aureus* et *P. aeruginosa* varient entre 10µg/ml et 250µg/ml (Mulwad *et al.*, 2008 ; Rostom *et al.*, 2009 ; Kategaonkar *et al.*, 2010 ; Ramiz *et al.* 2011).

2.2. Concentrations minimales inhibitrices contre les souches d'origine hospitalière.

Les résultats du tableau 5 montrent que SB9 est doté d'une activité inhibitrice contre les souches testées. Les souches *E.coli H* et *P.aeruginosa A* ont été révélées plus sensibles (CMI = 1.25mg/ml) que *E.coli A*, *S. aureus A*, *S.aureus H* et *Streptococcus spp A* (CMI = 2,5mg/ml) (Tableau5).

Tableau 5 : Concentrations minimales inhibitrices (mg/ml) du SB 9 sur les souches d'origine hospitalière.

Concentration Souches (mg/ml)	2.5	1.25	0.625	0.31	0.15	0.07	Témoin
<i>E.coli A</i>	-	+	+	+	+	+	+
<i>E.coli H</i>	-	-	+	+	+	+	+
<i>S.aureus A</i>	-	+	+	+	+	+	+
<i>S.aureus H</i>	-	+	+	+	+	+	+
<i>P.aeruginosa A</i>	-	-	+	+	+	+	+
<i>Streptococcus spp A</i>	-	+	+	+	+	+	+

Les valeurs de CMI obtenues avec SB 13 indiquent que ce produit a un effet inhibiteur plus important que celui obtenu avec SB 9. En effet, toutes les souches ont été inhibées avec une concentration de 1.25 mg/ml à l'exception de la souche *E.coli* qui a été révélée moins sensible vis-à-vis de SB 13 avec une CMI de l'ordre de 2.5 mg/ml (Tableau 6).

Tableau 6 : Concentrations minimales inhibitrices (mg/ml) du SB 13 contre les souches d'origine hospitalière.

Concentration Souches (mg/ml)	2.5	1.25	0.625	0.31	0.15	0.07	Témoin
<i>E.coli A</i>	-	+	+	+	+	+	+
<i>E.coli H</i>	-	-	+	+	+	+	+
<i>S.aureus A</i>	-	-	+	+	+	+	+
<i>S.aureus H</i>	-	-	+	+	+	+	+
<i>P.aeruginosa A</i>	-	-	+	+	+	+	+
<i>Streptococcus spp A</i>	-	-	+	+	+	+	+

Les travaux de **Morjan *et al.* (2015)** ont montré que les dérivés 5-oxo et 5-thio-tétrazoles 1,4-disubstitués inhibent la croissance des souches isolées de l'environnement hospitalier ; *S.aureus* et *E.coli* avec une CMI de 0.2 mg/ml et 0.6 mg/ml respectivement.

❖ **Comparaison des effets des produits chimiques dérivés de tétrazoles sur les différentes souches testées** (Tableau 7 et Figure 18)

Tableau 7 : Comparaison des CMI de SB 9 et SB 13 sur les souches testées.

Souches bactériennes	CMI du SB 9 (mg/ml)	CMI du SB 13 (mg/ml)
<i>E.coli R</i>	1.25	1.25
<i>P.aeruginosa R</i>	0.62	0.62
<i>S.aureus R</i>	2.5	1.25
<i>B.subtilis R</i>	2.5	1.25
<i>E.coli A</i>	2.5	2.5
<i>E.coli H</i>	1.25	1.25
<i>P.aeruginosa A</i>	1.25	1.25
<i>S.aureus A</i>	2.5	1.25
<i>S.aureus H</i>	2.5	1.25
<i>Streptococcus spp A</i>	2.5	1.25

Les deux produits SB 9 et SB 13 ont la même CMI sur les souches à Gram négatif (*E.coli* et *P.aeruginosa*). Par rapport à SB 9, le produit SB 13 est plus actif sur les souches à Gram positif (*S.aureus*, *B.subtilis* et *Streptococcus spp*).

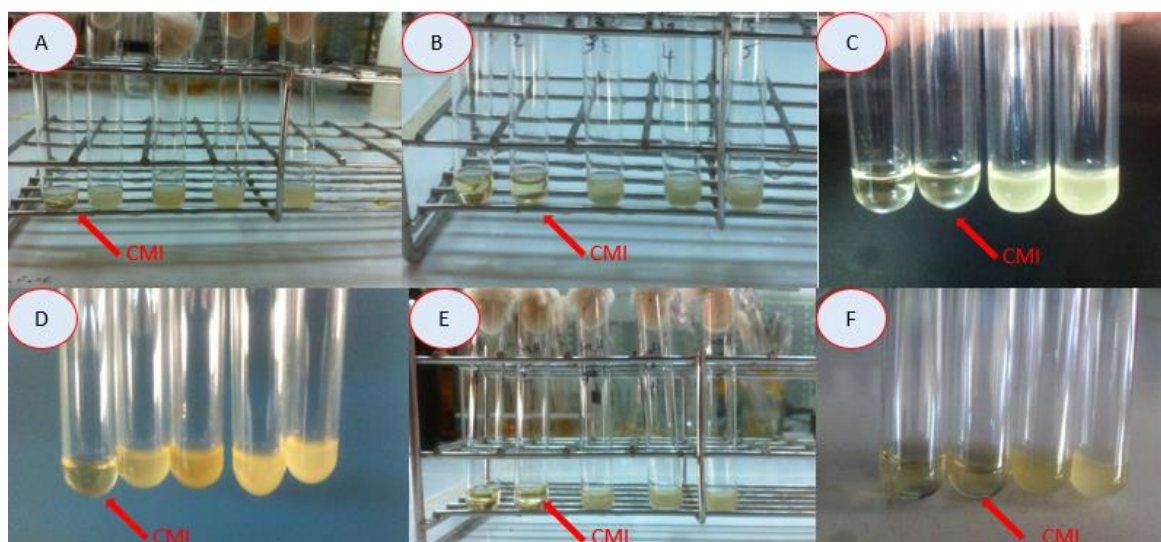


Figure 18 : Expression des CMI en milieu liquide (Macrodilution) : **A** : CMI de SB 9 sur *E.coli* A, **B** : CMI de SB 13 sur *E.coli* H, **C** : CMI de SB 13 sur *P.aeruginosa* A, **D** : CMI de SB 9 sur *S.aureus* A, **E** : CMI de SB 13 sur *S.aureus* H, **F** : CMI de SB 13 sur *Streptococcus* spp A.

III. Détermination des concentrations minimales bactéricides (CMB)

La concentration minimale bactéricide des deux produits SB 9 et SB 13, qui correspond à la plus faible concentration de ces produits ayant montré un nombre maximum de 5 colonies sur boîte, a été déterminée. Les tableaux 8, 9, 10 et 11 représentent les résultats des CMB obtenus sur les souches ATCC et les souches d'origine hospitalière.

3.1. Concentrations minimales bactéricides contre les souches de références ATCC.

La CMB du produit SB 9 est de 2.5 mg/ml sur les deux souches *E.coli* R, *P.aeruginosa* R, elle est par contre supérieure à 2,5 mg/ml pour les souches *S.aureus* R et *B. subtilis* R (Tableau 8).

Tableau 8 : Concentrations minimales bactéricides (mg/ml) du SB9 sur les souches ATCC.

Concentration (mg/ml) \ Souches	2,5	1,25	0,625
<i>E.coli</i> R	-	+	+
<i>S.aureus</i> R	+	+	+
<i>B.subtilis</i> R	+	+	+
<i>P.aeruginosa</i> R	-	+	+

Le tableau 9 montre que la concentration minimale bactéricide de SB 13 est de 2.5 mg/ml pour toutes les souches ATCC.

Tableau 9 : Concentrations minimales bactéricides (mg/ml) du produit SB 13 sur les souches ATCC.

Concentration en (mg/ml) Souches	2,5	1,25	0,625
<i>E.coli R</i>	-	+	+
<i>S.aureus R</i>	-	+	+
<i>B.subtilis R</i>	-	+	+
<i>P.aeruginosa R</i>	-	+	+

Les travaux de Rao *et al.* (2012) ont montré que les CMB de certains dérivés de tétrazoles varient entre 0,5 à 1 mg/ml contre les souches *S. aureus* et *B. subtilis*. Alors que la CMB contre *E.coli* est de l'ordre de 6,25mg/ml.

SB 9 a un effet bactéricide sur *E.coli R* et *P.aeruginosa R*, alors que SB 13 a un effet bactéricide sur toutes les souches ATCC testées (CMB/CMI \leq 4).

3.2. Concentrations minimales bactéricides contre les souches d'origine hospitalière.

La CMB du SB 9 est de 2.5 mg/ml sur la souche de *P.aeruginosa A* et *Streptococcus spp A*. Alors que les autres souches sont résistantes au produit SB 9 et la CMB est supérieure à 2.5 mg/ml (Tableau 10).

Tableau 10 : Concentrations minimales bactéricides (mg/ml) du SB9 sur les souches d'origine hospitalière.

Concentration(mg/ml) Souches	2,5	1,25	0,625	0,31	0.15
<i>E.coli A</i>	+	+	+	+	+
<i>E.coli H</i>	+	+	+	+	+
<i>S.aureus A</i>	+	+	+	+	+
<i>S.aureus H</i>	+	+	+	+	+
<i>P.aeruginosa A</i>	-	+	+	+	+
<i>Streptococcus spp A</i>	-	+	+	+	+

Le produit SB 13 a une CMB de 2.5 mg/ml sur les deux souches d'*E.coli*, ainsi que sur *P.aeruginosa A*. La CMB de SB13 sur les souches *S.aureus A*, *S.aureus H* et *Streptococcus spp A* est de 1.25 mg/ml (Tableau 11).

Tableau 11 : Concentrations minimales bactéricides (mg/ml) du SB13 sur les souches d'origine hospitalière.

Concentration (mg/ml) \ Souches	2,5	1,25	0,625	0,31	0.15
<i>E.coli A</i>	-	+	+	+	+
<i>E.coli H</i>	-	+	+	+	+
<i>S.aureus A</i>	-	-	+	+	+
<i>S.aureus H</i>	-	-	+	+	+
<i>P.aeruginosa A</i>	-	+	+	+	+
<i>Streptococcus spp A</i>	-	-	+	+	+

Le produit SB 9 a un effet bactéricide sur *P.aeruginosa A* et *Streptococcus ssp A*, alors que SB 13 a un effet bactéricide sur toutes les souches d'origine hospitalières testées (CMB/CMI \leq 4).



*Conclusion &
perspectives*

Ce travail s'inscrit dans le cadre des travaux de recherche du Laboratoire de Biotechnologie en collaboration avec le Laboratoire de Chimie Organique (Faculté des Sciences Dhar El Mahraz) dont l'un des objectifs majeurs est la recherche de nouvelles molécules bioactives. Nous avons pour cela testé l'effet antibactérien de deux dérivés de tétrazoles SB 9 et SB 13 contre des souches isolées du milieu hospitalier et des souches de références.

Une évaluation de l'activité antibactérienne des souches testées aux SB 9 et SB 13 a été réalisée par la méthode de diffusion sur disque. Les concentrations minimales inhibitrices ont été déterminées par deux méthodes : la méthode de macrodilution et de microdilution en milieu liquide.

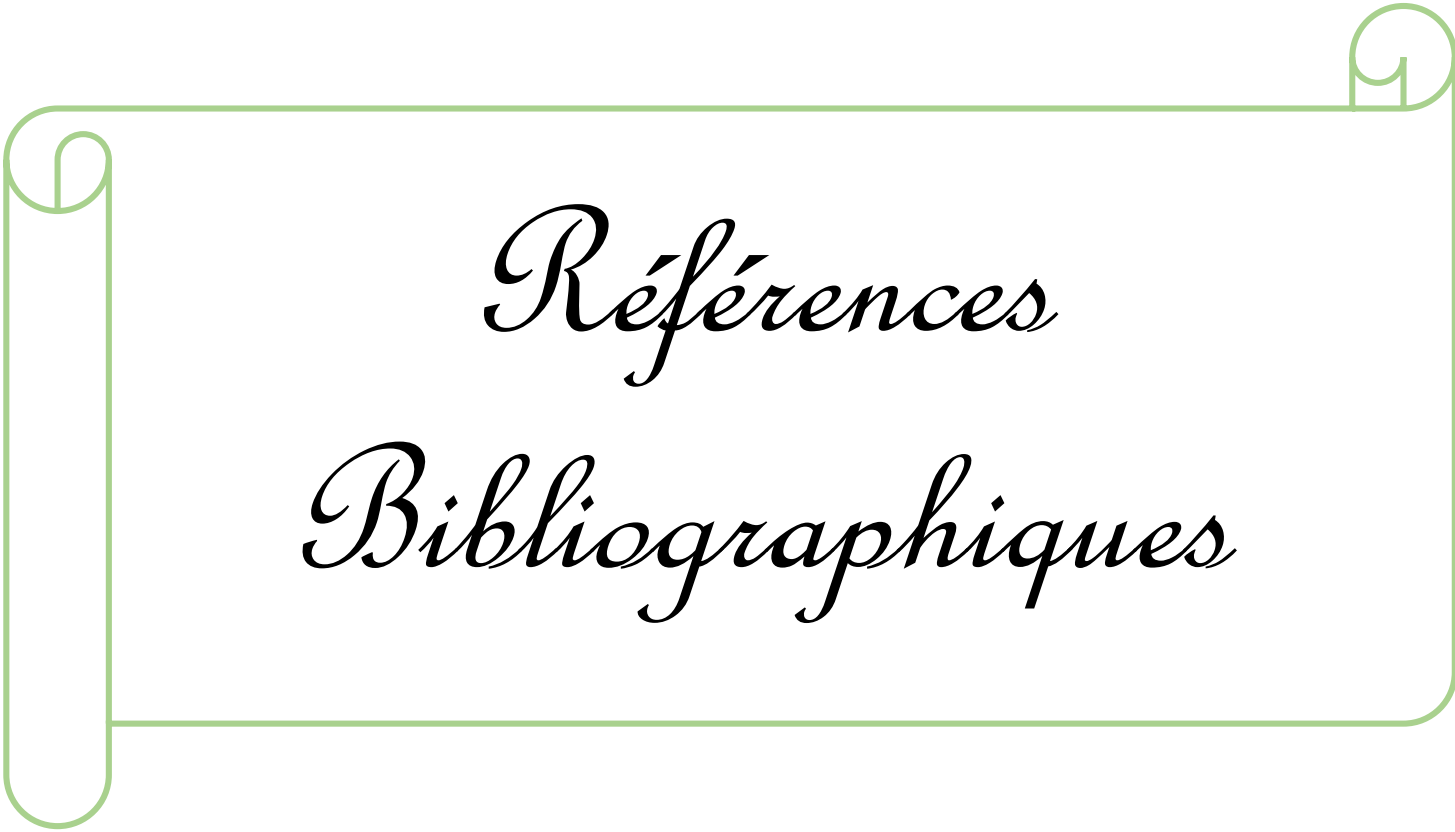
Le produit SB 9 s'est révélé plus actif sur les souches *E.coli R* (9 mm), *P.aeruginosa R* (12 mm) et *E.coli H* (14.5mm). Ce produit a présenté une forte activité inhibitrice sur *P.aeruginosa A* avec un halo d'inhibition de 14 mm qui est supérieur à celui obtenu par l'ampicilline (5 mm). En effet, ce produit inhibe toutes les souches avec une CMI allant de 1.25mg/ml à 2.5mg/ml à l'exception de *P.aeruginosa R* (CMI= 0.62mg/ml). Le produit SB 13 est plus actif sur *P.aeruginosa R* (12.5mm) et *S.aureus H* (8.5mm).

Les valeurs de CMI montrent que SB 13 est plus actif que SB 9. En effet, SB 13 inhibe toutes les souches avec une CMI de 1.25mg/ml à l'exception de *P.aeruginosa R* (CMI=0.62mg/ml) et *E.coli A* (CMI = 2.5mg/ml).

Les résultats de CMB des produits testés ont montré que le produit SB 9 a un effet bactéricide contre *E.coli R*, les deux souches de *P.aeruginosa* et *Streptococcus spp A*. Alors que SB 13 a un effet bactéricide sur toutes les souches testées.

On peut conclure que les deux produits ont une activité intéressante sur les souches d'origine hospitalière en particulier *E.coli H*, *S.aureus H*, *Streptococcus spp A* et *P.aeruginosa A*.

Ce travail constitue une approche dans la conception de composés des dérivés de tétrazoles pouvant servir comme alternative aux antibiotiques et aux désinfectants. Il reste à évaluer la toxicité de ces molécules synthétiques afin de confirmer leurs usages en pharmacologie pour une éventuelle utilisation thérapeutique et hygiénique. En plus, il serait intéressant d'étudier l'effet de la combinaison avec d'autres molécules actifs afin d'augmenter leurs spectre d'activité, ou tester leurs effets sur les cultures cellulaires. Enfin, il serait important d'élargir les travaux sur ces dérivés et leurs activités biologiques et pharmacologiques intéressantes telles que l'activité antifongique, inflammatoire, antivirale et anticancéreuse.



*Références
Bibliographiques*

Alami A., El Hallaoui A., Elachqar A., Roumestant M.L., Viallefont Ph., 1996.

Use of 5-substituted Tetrazole in a synthesis of heterocycl α -Amino Esters
Bull. Soc. Chem. Belg; 12; 769.

Alekshun M.N & Levy S.B., 2007.

Molecular mechanism of antibacterial multidrug resistance.
Cell, 128: 1037-1050

Amantini D., Beleggia R., Fringuelli F., Pizzo F. and Vaccaro L., 2004.

TBAF-Catalyzed Synthesis of 5-Substituted 1H-Tetrazoles under Solventless Conditions.
Journal of Organic Chemistry, 69: 2896-2898.

Amigoni S., Fensterbank H., Gaucher H., 2004. Chimie Organique ; Chap 1. Ed Belin.

Appelbaum P. C., 1992.

Antimicrobial Resistance in Streptococcus pneumonia
Clinical Infectious Diseases, 15, 77-83.

Baraduc, R., Darfeuille-Michaud, A., Forestier, C., Jallat, C., Joly, B., and Livrelly, D. 2000.

Escherichia coli et autres *Escherichia*, *Shigella*.
Précis de bactériologie clinique. Editions ESKA: 1115-1126.

Bean G. P., 1998.

Application of Natural Bond Orbital Analysis and Natural Resonance Theory to Delocalization and Aromaticity in Five-Membered Heteroaromatic Compounds.
J. Org. Chem., 63 (8): 2497–2506.

Benson F. R., 1947.

The Chemistry of the Tetrazoles.
Chem. Rev., 41(1): 1–61.

Bently R. and Bennett J. W., 2003.

What Is an Antibiotic?
Revisited, *Advances in applied microbiology*, 52: 303-331.

Berche P., Gaillard J.L., Simonet M., 1988.

In Nosocomial Infections Caused by bacteria and Their Prevention in bacteriology.
Edited by Flammaton Medecine Sciences; 64-71.

Bekkari H., Touijer H., Berrada S., Ettaybi M., Benchemsi N., Maniar S. and El Ouali Lalami A., 2016.

Surveillance of bacteriological quality and resistance to disinfectants and antibiotics in a provincial hospital in Morocco.
J.Mater.Environ.Sci. ; 7 (1) 1-8.

Bhaskar V. H., Mohite P. B., 2010.

Synthesis, characterization and evaluation of anticancer activity of some tetrazole derivatives,
Journal of Optoelectronics and Biomedical Materials, 2(4) : 249 – 259.

Bladin J.A., 1885.

About dicyanophenylhydrazine derived compounds.
Chem. Ber., 18: 1544-1551.

Boukhssas S., Aouine Y., H. Faraj, Alami A., El Hallaoui A., and Bekkari H., 2017.

Synthesis, Characterization, and Antibacterial Activity of Diethyl 1-((4-Methyl-2-phenyl-4,5-dihydrooxazol-4-yl)methyl)-1H-1,2,3-triazole-4,5-dicarboxylate.
Journal of Chemistry, 6 p

Brown N., 2012.

“Bioisosteres in Medicinal Chemistry”, 1-14.

Butler R. N., 1984. In Comprehensive Heterocyclic Chemistry II; A. R. Katritzky, C.W. Rees, Eds., Pergamon Press: Oxford, 5: 791.

Castellani A., Chalmers A.J., 1919.

Manual of tropical medicine, 3rd ed., Wililliams Wood and Co., New York.

Chang C.-S., Lin Y.-T., Shih S.-R., Lee C.-C., Lee Y.-C., Tai C.-L., Tseng S.-N., and Chern J.-H., 2005.

Design, Synthesis, and Antipicornavirus Activity of 1-[5-(4 Arylphenoxy) alkyl]-3-pyridin-4-ylimidazolidin-2-one Derivatives.

Journal of Medicinal Chemistry, 48 (10): 3522–3535.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.

Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard-ninth edition. 32 (2): M02-A9.

Cubero E., Orozco M., Luque F. J., 1998.

Theoretical Study of Azido-Tetrazole Isomerism: effect of Solvent and substituents and Mechanism of Isomerization;

J. Am. Chem.Soc.; 120; 4723

Delarras C., 1998. Microbiologie. 90 heures de travaux pratiques. Gaétan Morien editeur. : 169-178.

Demirbas N., Karaoglu S.A., Demirbas A., Sancak K., 2004.

Synthesis and antimicrobial activities of some new 1-(5-phenylamino-[1,3,4]thiadiazol-2-yl)methyl-5-oxo-[1,2,4]triazoles and 1-(4-phenyl-5-thioxo-[1,2,4]triazol-3-yl)methyl-5-oxo- [1,2,4]triazoles derivatives.

European Journal of Medicinal Chemistry ; 39 : 793–804.

Dhayanithi V., Shafi sayed S., Ramasamy V. R, Kumaran K., Sankar J., Raguraman K. G., Nalilu S. K., Pati H. N., 2010.

Synthesis and evaluation of a series of 1-substituted tétrazole derivatives as antimicrobial agents,

Org. Commun. 3 (3) : 45-56.

Dhayanithi V., Shafi sayed S., Kumaran K., Sankar K.J., Ragavan R. V., Goud P. S., Kumari N. S. and Pati H. N.,2011.

Synthesis of selected 5-thio-substituted tetrazole derivatives and evaluation of their antibacterial and antifungal activities,

J. Serb. Chem. Soc. 76 (2).

Diakaria G., 2002.

Etude de la prévalence des infections nosocomiales d’origine bactérienne dans le service de néphrologie et dans l’unité d’hémodialyse à l’Hôpital du Point G, Faculté de Médecine de Pharmacie et D’Odonto-Stomatologie.

El Hamzaoui S., Benouda A., Allali F., Abouqual R. et Elouennass M., 2009.

Sensibilité aux antibiotiques des souches de Staphylocoques aureus isolées dans deux hôpitaux universitaires à Rabat, Maroc.

Médecine et maladies infectieuses. 39 : 891–895.

El Rhazi K., Elfakir S., Berraho M., Tachfouti N., Serhier Z., Kanjaa C., et Nejari C., 2007.

Prévalence et facteurs de risque des infections nosocomiales au CHU Hassan II de Fès (Maroc).

La Revue de Santé de la Méditerranée orientale, 13 (1) : 56-63.

EUCAST, European Committee on Antimicrobial susceptibility Testing, 2015.

Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie, recommandations ; V1.0 Janvier 2015.

Farmer, J.J., Boatwright, K.D., and Janda, J.M. 2007.

Enterobacteriaceae: Introduction and identification.

Manual of Clinical microbiology. Washington, DC, USA: ASM press. 9th ed: 649-669.

Finnegan W. G., Henry R. A., Lofquist R., 1958.

An Improved Synthesis of 5-Substituted Tetrazoles.

J. Am. Chem. Soc. 80(15) : 3908-3911

Gatsing D., Tchakoute V., Ngamga D., Kuate J.K., Tamokou J.D.D, 2009.

In vitro antibacterial activity of crinum purpurascens herb. Leaf extract against the Salmonella species causing typhoid fever and its toxicology evaluation;

Iran. J. Med. Sci.; 34: 126-137

Goossens H., Guillemot D., Ferech M., Schlemmer B., Costers M., van Breda M., Baker L.J., Cars O. and Davey PG., 2006.

National campaigns to improve antibiotic use.

European Journal of Clinical Pharmacology, 62: 373-379.

Hansch C., Leo L., 1995.

Exploring QSAR. Fundamentals and Applications in Chemistry and Biology;

American Chemical Society: Washington, DC.

Hellal A., Chafaa S., Chafai N., 2015.

Synthesis, antimicrobial and antifungal screening of three new of Alpha-aminophosphoric acids;

International Journal of Scientific and Engineering Research, 6 (8).

Herr R. J., 2002.

5-Substituted-1H-tetrazoles as carboxylic acid isosteres : medicinal chemistry and synthetic methods.

Bioorg. Med. Chem., 10: 3379-3393.

Ishankhodzhaeva M. M., 2001.

Crystalline and Molecular Structure of 2-Amino-5-phenyl-1,3,4-thiadiazole

Russ. J. Org. Chem., 37, No. 5, 721-723

Jaureguy, F. 2009.

Host and bacterial determinants of *Escherichia coli* extra intestinal infections.

Med Sci, Paris. 25(3): 221-223.

Joly B., Freney J., 1996.

La résistance des bactéries aux antiseptiques et désinfectants.

Hygiènes, 15 : 39-46.

Joule J.A. et Mills K., 2000.

"Heterocyclic chemistry", 4th edition, Blackwell Publishing House, pp507-511.

Kategaonkar A. H., Pokalwar R. U., Sonar S. S., Gawali V. U, Shingate B.B., Shingare M. S., 2010.

Synthesis, in vitro antibacterial and antifungal evaluations of new α -hydroxyphosphonate and new α -acetoxyphosphonate derivatives of tetrazolo [1, 5-a] quinoline,

European Journal of Medicinal Chemistry, 45; 1128–1132.

Kleemann A. and Engel J., 1999.

In 'Pharmaceutical Substances: Syntheses, Patents, Applications', Eds.; Thieme, Stuttgart,

Kolb H. C., Finn M. G. and Sharpless K. B., 2001.

Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions.
Angew. Chem., Int. Ed., 40, 2004.

Laub G.R., 1986.

Discovery of the sulfa drugs.
Southern Medical Journal, 79: 782

Le Minor L., Popoff M. Y. and Bockemuhl J., 1990.

Supplement 1989 (n. 33) to the Kauffmann-White scheme.
Res Microbiol. 141:1173-1177.

Legras J.F., L.M.Q., Trieu, Kirkiacharian S., 1998.

Ecologie bactérienne des infections dans un hôpital de gériatrie.
Journal de Pharmacie Clinique, 17(4) : 232-40.

Levine, M. 1987.

Escherichia coli that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent.
Journal of Infectious Diseases, 155: 377-389.

Lewis W. G., Green L. G., Grynszpan F., Radić Z., Carlier P. R., Taylor P., Finn M. G. and Sharpless K. B., 2002.

Click Chemistry In Situ: Acetylcholinesterase as a Reaction Vessel for the Selective Assembly of a Femtomolar Inhibitor from an Array of Building Blocks.
Angew. Chem., Int. Ed., 41, 1053.

Mahmoud N., Yadollah B., Davood H. and Saeed M., 2009.

FeCl₃-SiO₂ as a reusable heterogeneous catalyst for the synthesis of 5-substituted 1*H*-tetrazoles via [2+3] cycloaddition of nitriles and sodium azide.
Tetrahedron Letters, 50 (31): 4435-4438.

Markham P.N. & Neyfakh A.A., 2001.

Efflux-mediated drug resistance in Gram-positive bacteria,
Current Opinion Microbiology, 5:509-514.

Matysiak J., Niewiadomy A., Krajewska-Kulak E., 2003.

Synthesis of some 1-(2,4-dihydroxythiobenzoyl)imidazoles, -imidazolines and -tetrazoles and their potent activity against *Candida* species,
Il Farmaco, 58 (6) : 455-461.

Mekuskiene G., 2003. *Khim. Geterostsiki. Soedin.*, 39, No. 10, 1364-1368

Mickevičius V., Vaickelionien R., Sapijanskait B., 2009. *Khim. Geterostsiki. Soedin.*, 45, No. 2, 215-218.

Mohite P.B., Bhaskar V.H., 2011- Potential Pharmacological Activities of Tetrazoles in The New Millennium, *International Journal of PharmTech Research*, 3 (3): 1557-1566.

Mohite P.B., Pandhare R.B., Khanage s.G., Bhaskar V.H., 2010.

Synthetic and *in vitro* antimicrobial activity of some novel chalcones containing 5-phenyltetrazole,
acta Pharmaceutica Scientia, 52: 505-510.

Molitor. A., 2010.

Thèse de Doctorat : Régulation de la perméabilité membranaire chez les bactéries à Gram négatif et la relation avec la sensibilité aux antibiotiques. Université de Médecine, Marseille, France.

Morjan R.Y., El-Attar N.H., Abu- Teimb O. S., Ulrich M., Awadallaha A. M., Mkadmh A. M., Elmanama A.A., Raftery J., Abu-Awwad F.M., Yaseen Z. J., Elqidrea A. F., Gardiner J. M., 2015.

Synthesis, antibacterial and QSAR evaluation of 5-oxo and 5-thio derivatives of 1, 4-disubstituted tétrazoles, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*

Mosaad Sayed M., R., Ahmed E.D., Rania H. A.H., 2009.

Synthesis of certain pyrrole derivatives as antimicrobial agents.
Acta Pharm, 59:145–158.

Mottier D., 2007.

Critères de choix d'un antibiotique en 2007 Efficacité pour le patient Préservation de l'écologie bactérienne,
Médecine et maladies infectieuses. 38 : 1–2

Mulwad V. V., Pawar R. B., and Chaskar A. C., 2008.

Synthesis and Antibacterial Activity,
Journal of the Korean Chemical Society, 52, (3): 249-256

Nakano M.M., Dailly Y..P., Zuber P., Clark D.P., 1997.

Characterization of Anaerobic Fermentative Growth of *Bacillus subtilis*: Identification of Fermentation End Products and Genes Required for Growth.
Journal of bacteriology, 179 (21) : 7.

Noble W.C., Virani Z., Cree R.G., 1992.

Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*.
FEMS Microbiology Letters, 72 : 195-198.

Oggioni M.R., Pozzi G., Valensin P.E., Galieni P. and Bigazzi C., 1998.

Recurrent Septicemia in an Immunocompromised Patient Due to Probiotic Strains of *Bacillus subtilis*.
Journal of clinical microbiology, 36(1) : 325-6

Ostrovskii V. A., Koren A. O., 2000.

Heterocycles, 53, 1421.

Patil U.B., Kumthekar K.R., Nagarkar J.M., 2012.

A novel method for the synthesis of 5-substituted 1H-tetrazole from oxime and sodium azide.
Tetrahedron Letters, 53(29): 3706-3709.

Pohl P., 1993.

Les souches pathogènes d'*Escherichia coli*, histoire et classification.
Annales de médecine vétérinaire, 137:325-333.

Piggot P.J., 2009.

Bacillus Subtilis A2 - Schaechter, Moselio.
Encyclopedia of Microbiology (Third Edition), p. 45-56

Ramiz M.M., Abdel-Rahman A.A.H., 2011.

Antimicrobial activity of newly synthesized 2,5-disubstituted 1, 3, 4-thiodiazole derivatives.
Bull. Korean Chem. Soc. 32 : 4227-42320.

Rao S. N., Raviskankar T., Latha J. and Sudhakar Babu K., 2012.

Synthesis, characterization and antimicrobial activity of novel biphenyl tétrazoles;
Der Pharma Chémico; 4 (3): 1093-1103.

Rebiahi S.A., Abdelouahid D.E, Rahmounb M., Abdelali S. et Azzaoui H., 2011.

Emergence de souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la vancomycine isolées du centre hospitalo-universitaire de Tlemcen (Algérie Nord-ouest).
Médecine et maladies infectieuses. 41: 646–65

Reidalova L.I., Shivanyuk A., Daskovskaya E., Stepura G., Losinskii M.O., 1988.

Synthèse et étude structurale par diffraction des rayons X de nouveaux complexes et polymères de coordination : *Fiziol. Akt. Veshchestova* ; 20 ; 44.

Rice L.D., Sahn D. Bonomo, R.A., 2003.

Mechanisms of resistance to antimicrobial agents. In: Murray, P.R. (Ed.), Manual of Clinical Microbiology, 1, eighth ed. ASM Press, Washington, p. 1074.

Rostamizadeh S., Ghaeni H., Aryan R. and Amani A., 2009.

Zinc chloride catalyzed synthesis of 5-substituted 1H-tetrazoles under solvent free condition. *Chinese Chemical Letters*, 20, 1311-1314.

Rostom S. A. F. , Ashour Hayam M. A., Heba A. Abd El Razik H. A., Abd El Fattah A.H., El-Din N. N.,2009.

Azole antimicrobial pharmacophore-based tetrazoles: Synthesis and biological evaluation as potential antimicrobial and anticonvulsant agents, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17: 2410–2422.

Roy A., Lahiri S. C., 1985.

Studies on two novel anti-inflammatory indanylmethyltetrazoles; *Indian J. Pharmacol.*; 17; 63.

Russel A.D., Furr J. R., Maillard J.Y., 1997.

Microbial susceptibility and Resistance to Biocides, *ASM News*, 63: 481-487.

Salahuddin M., S., Singh and Shantakumar S.M., 2009.

Synthesis of Some Novel Benzo Thieno [2, 3-d] pyrimidines. *Rasayan journal of chemistry*, 2 (1):167-173.

Singh H., Chawla A.S., Kapoor V.K., Paul D. and Malhotra R.K., 1984.

Progress in medicinal chemistry; ed. G .P. Ellis and G. B. West, Elsevier, North-Holland, 17; p.151, 1980. NR. N. Buttler, *Comp. Heterocycl. Chem.*, 1st edn., 5, 791.

Singh S.B and Barrett J.F, 2006.

Empirical antibacterial drug discovery foundation in natural products. *Biochemical Pharmacology*.71: 1006-1015

Sudhakar B. K., Somiseti N.R., Ravisankar T., Latha J., 2012.

Synthesis, Characterization and antimicrobial activity of novel biphenyl tetrazoles; *Der Pharma Chemica*, 4 (3): 1093-1103.

Sunil D., 2010.

6-[3-(4-Fluorophenyl)-1H-pyrazol-4-yl]-3-[(2-naphthyloxy)methyl][1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazole as a potent antioxidant and an anticancer agent induces growth inhibition followed by apoptosis in HepG2 cells
Med. Chem. Res., 9: 9436-9442

Sylvie C., 2009.

B.Pharm, M.Sc., est pharmacienne et adjointe aux soins pharmaceutiques au Centre universitaire de sante McGill Pharmactuel, 42.

Walker M. A., Johnson T., Ma Z., Banville J., Remillard R., Kim O., Zhang Y., Staab A., Wong H., Torri A., Samanta H., Lin Z., Deminie C., Terry B., Krystal M., and Meanwell N., 2006.

Triketoacid inhibitors of HIV-integrase: A new chemotype useful for probing the integrase pharmacophore, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 16(11): 2920-2924.

Walsh, C., 2003.

Antibiotics: actions, origins, resistance. Washington, D.C., ASM Press.

Wan J., Yan X., C Ma C., Bi S. and HL Zhu HL., 2010.

Synthesis, structure characterization, and biological evaluation of some new 1, 2, 3 benzotriazole derivatives
Med. Chem. Res., 19, 970–983

Yoneyama H., Usami Y., Komeda S., Harusawa S., 2013.

Efficient Transformation of Inactive Nitriles into 5-Substituted 1H-Tetrazoles Using Microwave Irradiation and Their Applications;
Synthesis; 45: 1051.

Yildirim Y., M. Faruk U., Naki C., Ozkan H., Yavuz S., Disli A., Ozturk S., Turke L., 2009.

The synthesis and investigation of the antimicrobial activity of some new phenylselanyl-1-(toluene-4-sulfonyl)-1H-tetrazole derivatives,
Med Chem Res, 18:91–97.



Annexes

Annexes

Annexe 1 : Composition du milieu Luria-Bertani (LB)

Milieu LB liquide

- | | |
|---------------------|--------|
| • Peptone | 10g |
| • Extrait de levure | 5g |
| • NaCl | 10g |
| • Eau distillée | 1000ml |

Milieu LB Solide

- | | |
|---------------------|--------|
| • Peptone | 10g |
| • Extrait de levure | 5g |
| • NaCl | 10g |
| • Agar | 15g |
| • Eau distillée | 1000ml |

Annexe 2 : Protocol de préparation du standard McFarland 0.5

Le standard McFarland 0.5 est préparé par ajout d'une solution de BaCl_2 à 0.048 mol/l et H_2SO_4 0.18 mol/l.

- Préparation d'une solution de BaCl_2 à 0.048 mol/l (1.175% p/v $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

Préparation de 10 ml de BaCl_2 par solubilisation de 0.1175 g de $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dans 10 ml d'eau distillée.

- Préparation d'une solution de 100 ml de H_2SO_4 0.18 mol/l (1% v/v) dans 100 ml d'eau distillée.
- Préparation du McFarland 0.5
 - Ajout de 0.5 ml de la solution de BaCl_2 à 99.5 ml d'une solution de 0.18 mol/l H_2SO_4 et agiter vigoureusement
 - La densité optique de la solution obtenue doit être comprise entre 0.08 et 0.13 à 625nm.



Université Sidi Mohammed Ben Abdellah
Faculté des Sciences et Techniques de Fès

www.fst-usmba.ac.ma

Mémoire de Fin d'étude pour l'obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques

Nom et Prénom : HSSAINI Mohamed

Année universitaire : 2017/2018

Evaluation de l'activité antibactérienne des dérivés de tétrazoles sur des souches isolées du milieu hospitalier.

Résumé :

La résistance des bactéries aux antibiotiques et aux désinfectants est devenue une véritable préoccupation. L'hôpital présente un environnement favorable à la colonisation et l'apparition des bactéries résistantes aux antibiotiques et aux désinfectants. La recherche de nouveaux composés antimicrobiens s'avère indispensable pour lutter contre ce phénomène. Les dérivés de tétrazoles peuvent représenter une solution par leur activité antibactérienne intéressante. Dans ce travail, Deux produits de dérivés de tétrazoles ; Le thiophène 2-carbaldéhyde (SB 9) et le 5-(thiophén-2-yl)-1H-tétrazole (SB 13), ont été évalués de leurs activités antibactériennes contre un ensemble de souches de références et des souches isolées de l'environnement hospitalier. L'étude de l'effet antibactérien a été réalisée par la méthode de diffusion sur disque et par la détermination de la CMI et la CMB. Le produit SB 13 a un spectre d'activité plus large que SB 9. Ce dernier a une activité bactéricide seulement sur les Gram négatif *E.coli*, *P.aeruginosa* avec des CMI allant de 0.62 mg/ml à 2.5 mg/ml alors que SB 13 a un effet bactéricide sur toutes les souches avec des CMI allant de 0.62 mg/ml à 1.25 mg/ml.

Les deux produits ont une activité inhibitrice importante sur les souches testées en particulier *E.coli* H, *S.aureus* H et *P.aeruginosa* et *Streptococcus spp* A. Il a été constaté que ces activités varient en fonction de la souche microbienne testée et de produit appliqué.

Mots clés : Activité antibactérienne, Tétrazole, CMI, Environnement hospitalier, Bactéries résistantes.

Faculté des Sciences et Techniques Fès

B.P. 2202, Route d'Imouzzer FES

212 (35) 60 80 14 – 212 (35) 60 96 35 212 (35) 60 82 14

www.fst-usmba.ac.ma

Abstract :

The resistance of bacteria to antibiotics and disinfectants has become a real concern. The hospital has a favorable environment for colonization and the appearance of bacteria resistant to antibiotics and disinfectants. The search for new antimicrobial compounds is essential to fight against this phenomenon. The derivatives of tetrazoles may represent a solution by their antibacterial activity of interest. In this work, two products of tetrazole derivatives; Thiophene 2-carbaldehyde (SB 9) and 5- (thiophen-2-yl) -1H-tetrazole (SB 13) were evaluated for their antibacterial activities against a set of reference strains and strains isolated from the hospital environment. The study of the antibacterial effect was carried out by the disk diffusion method and by the determination of the MIC and the MBC. The product SB 13 has a broader spectrum of activity than SB 9. The latter has bactericidal activity only on Gram-negative *E. coli*, *P. aeruginosa* with MICs ranging from 0.62 mg / ml to 2.5 mg / ml whereas SB 13 has a bactericidal effect on all strains with MICs ranging from 0.62 mg / ml to 1.25 mg / ml.

Both products have significant inhibitory activity on the strains tested in particular *E.coli* H, *S.aureus* H and *P.aeruginosa* and *Streptococcus spp* A. It has been found that these activities vary depending on the microbial strain tested and product applied.

Key words: Antibacterial activity, Tetrazole, MIC, Hospital environment, Resistant bacteria.