



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Biologie Animale

قسم : بيولوجيا الحيوان

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : *Génétique Moléculaire*

Les extraits de plantes comme alternative à la résistance de *Klebsiella pneumoniae*: Etude *in vitro* et *in silico*

Présenté et soutenu par : *ACHI Ibtissem*

Le : 28 /06/2016

BENREMILI Lina

Jury d'évaluation :

Présidente: Mme *SATTA D.* (PR. - UFM Constantine)

Examineur : M. *KRID A.* (MAA - UFM Constantine)

Examinatrice : Mme *REZGOUNE D.* (MCA - UFM Constantine)

Rapporteuse : Mme *BENCHERAIET R.* (MCA - UFM Constantine)

*Année universitaire
2015 - 2016*

Remerciements

On remercie Dieu qui nous a donné la force et le courage d'accomplir ce travail.

Nous souhaitons tout d'abord exprimer notre gratitude et nos vifs remerciements à Madame Bencharaïet pour son soutien, ses précieux conseils et sa contribution à l'achèvement de ce mémoire.

Tout notre respect et nos remerciements vont vers les membres du jury qui vont pleinement consacrer leurs temps et leur attentions afin d'évaluer notre travail, qui espérons le sera à la hauteur de leurs attentes.

Nous tenons à remercier Madame Bencharif, Directrice du laboratoire LCMC de nous avoir permis de réaliser notre mémoire au sein du laboratoire.

Nos remerciements vont également à toute l'équipe des laboratoires de bactériologie au niveau du CHU Benbadis et de l'hôpital El Bir de Constantine.

Nos remerciement les plus sincères s'adresse aussi à tous nos enseignant de Génétique Moléculaire : Un grand MERCI pour la formation que vous nous avez donnée.

Nous témoignons toute notre reconnaissance à toute personne qui a participé de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.

Nous tenons à exprimer particulièrement nos cordiaux remerciements et notre amour à nos familles. Que ce travail soit une preuve de l'estime, du dévouement et du respect qu'on a toujours eu pour vous.

Table des matières

Introduction générale	01
------------------------------------	----

Chapitre I : *Klebsiella pneumoniae* et sa résistance

I.1. Généralités	03
I.1.1. Description	03
I.1.2. Taxonomie	03
I.1.3. Réservoirs de <i>Kp</i>	04
I.1.4. Transmission	04
I.2. Caractères bactériologiques	04
I.2.1. Caractères enzymatiques et biochimiques	04
I.2.2. Caractères antigéniques	05
I.2.2.1. Organisation génomique	05
I.2.2.2. Comparaison entre deux souche de <i>Kp</i>	06
I.3. Pouvoir pathogène	07
I.3.1. Facteurs de pathogénicité /virulence	08
- α - <i>Les antigènes de surface</i>	08
- β - <i>Les adhésines</i>	09
- γ - <i>Les Sidérophores</i>	09
I.4. Inhibiteurs de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	10
I.4.1. Les inhibiteurs de synthèse (antibiotiques)	10
I.4.1.1. <i>Klebsiella pneumoniae</i>- antibiotiques	10
I.4.1.2. Les inhibiteurs naturels	12

Chapitre II : Les flavonoïdes

II.1. Introduction	13
II.2. Structure et classification des flavonoïdes	13
II.2.1. Biosynthèse des flavonoïdes	14
II.3. Distribution et localisation	14
II.4. Propriétés des flavonoïdes	15
II.4.1. L'activité antimicrobienne des flavonoïdes	15
II.5. <i>Klebsiella pneumoniae</i>- flavonoïdes	17

Chapitre III : Etude *in vitro*

III.1. Evaluation de l'activité antibactérienne et test de sensibilité	18
III.2. Matériel végétal	18
III.2.1. <i>L'Eucalyptus globulus</i> (<i>Myrtaceae</i>)(الصنوبر)	18
III.2.2. <i>Origanum vulgare</i> (<i>origan</i>/زرعتر)	19

III.2.3. <i>Le Rosmarinus officinalis</i> (le romarin/ارکلیل).....	20
III.3. Les techniques d'extraction.....	20
III.4. Matériel bactériologique.....	21
III.4.1. La préparation des souches.....	21
III.5. Lecture et analyse.....	22
III.6. Résultats et discussions.....	22
III.7. Conclusion.....	23

Chapitre IV : Etude *in silico* : *Klebsiella pneumoniae*/Flavonoïdes

IV.1. Introduction.....	24
IV.2. Docking moléculaire.....	24
IV.2.1. Les interactions protéine-ligands.....	25
IV.2.2. Les étapes du docking moléculaire.....	27
IV.3. Interaction flavonoïdes/4exs.....	28
IV.3.1. Molécules impliquées dans le docking.....	28
IV.3.1.1. Structure de 4exs.....	28
IV.3.1.2. Les ligands.....	29
A-Captopril.....	29
B-Carbapénème.....	29
C-Apigénine.....	
D-Chrysin.....	30
E-Lutéoline.....	30
IV.4. Interactions flavones/4exs.....	31
IV.4.1. Calcul de ΔG_{bind}	31
IV.4.2. Étude des complexes Flavones/4exs.....	32
IV.5. Conclusion.....	39

Conclusion générale

Références bibliographiques.....	43
----------------------------------	----

Liste des tableaux

Tableau 01 : Principaux caractères enzymatiques et biochimiques de l'espèce <i>Kp</i>	06
Tableau 02 : Les six plasmides contenus dans le génome de <i>Kp</i> HS1128.....	07
Tableau 03 : Différences et similarité de gènes entre les souches NTUH-2044 et MGH 78578.....	11
Tableau 04 : Profil de résistance et sensibilité de <i>Kp</i> aux antibiotiques.....	12
Tableau 05 : Distribution des mutations altérant le gène <i>gyrA</i>	15
Tableau 06 : Distribution des flavonoïdes dans quelques fruits et légumes.....	19
Tableau 07 : Concentrations exprimées en mg/ml des différents échantillons testés avec <i>Kp</i>	21
Tableau 08 : Diamètre d'inhibition de la croissance de <i>Klebsiella pneumoniae</i> (en mm).....	22
Tableau 09 : Liste des acides aminés impliqués dans le site actif de 4exs.....	29
Tableau 10 : Valeurs de ΔG_{bind} du complexe 4exs/flavones.	31
Tableau 11 : Liaisons hydrogène dans le complexe Captopril/4exs.....	32
Tableau 12 : Liaisons hydrogène dans le complexe Carbapénème/4exs.....	32
Tableau 13 : Liaisons hydrogène dans le complexe apigénine/4exs.	33
Tableau 14 : Liaisons hydrogène dans le complexe chrysine/4exs.	34
Tableau 15 : Liaisons hydrogène dans le complexe lutéoline/4exs.....	34
Tableau 16 : Liaisons hydrogène dans le complexe apigénine-7-OCH ₃ /4exs.....	35
Tableau 17 : Liaisons hydrogène dans le complexe apigénine-7-glucuronide/4exs.....	36
Tableau 18 : Liaisons hydrogène dans le complexe apigénine-7-glucoside/4exs.....	37
Tableau 19 : Liaisons hydrogène dans le complexe chrysine-7-OCH ₃ /4exs.	37
Tableau 20 : Liaisons hydrogène dans le complexe chrysine-7-Glucuronide/4exs.....	38
Tableau 21 : Liaisons hydrogène dans le complexe chrysine-7-O-glucoside/4exs.....	39

Liste des figures

Figure 01 : Schéma général de l'organisation génomique de <i>Kp</i>	05
Figure 02 : Schéma représentant les différents antigènes (<i>K</i> , <i>O</i> , <i>H</i>) des Entérobactéries.....	09
Figure 03 : Représentation schématique des facteurs de pathogénicité et de virulence de <i>kp</i>	10
Figure 04 : Structure de base des flavonoïdes.....	13
Figure 05 : Schéma simplifié de la biosynthèse des flavonoïdes.....	14
Figure 06 : Résultats obtenus après culture de 24h sur milieux M-H (A) et Hektoen (B).....	22
Figure 07 : Représentation schématique du docking moléculaire.....	25
Figure 08 : Les interactions de Van Der Waals.....	25
Figure 09 : Les liaisons hydrogène.....	26
Figure 10 : Les interactions hydrophobes.....	26
Figure 11 : Les interactions électrostatiques.....	27
Figure 12 : NDM-1 complexée avec le captopril.....	28
Figure 13 : le captopril dans le site actif de la bêtalactamase.....	32
Figure 14 : le captopril avec quelques résidus de la bêtalactamase.....	32
Figure 15 : la carbapénème dans le site actif de la bêtalactamase.....	33
Figure 16 : la carbapénème avec quelques résidus de la bêtalactamase.....	33
Figure 17 : l'apigénine dans le site actif de la bêtalactamase.....	33
Figure 18 : l'apigénine avec quelques résidus de la bêtalactamase.....	33
Figure 19 : la chryisine dans le site actif de la bêtalactamase.....	34
Figure 20 : la chryisine avec quelques résidus de la bêtalactamase.....	34
Figure 21 : la lutéoline dans le site actif de la bêtalactamase.....	35
Figure 22 : la lutéoline avec quelques résidus de la bêtalactamase.....	35
Figure 23 : l'apigénine-7-OCH ₃ dans le site actif de la bêtalactamase.....	35
Figure 24 : l'apigénine-7-OCH ₃ avec quelques résidus de la bêtalactamase.....	35
Figure 25 : l'apigénine-7-gluc dans le site actif de la bêtalactamase.....	36
Figure 26 : l'apigénine-7-gluc avec quelques résidus de la bêtalactamase.....	36
Figure 27 : l'apigénine-7-glc dans le site actif de la bêtalactamase.....	37
Figure 28 : l'apigénine-7-glc avec quelques résidus de la betalactamase.....	37
Figure 29 : la chryisine-7-OCH ₃ dans le site actif de la betalactamase.....	38
Figure 30 : la chryisine-7-OCH ₃ avec quelques résidus de la bêtalactamase.....	38
Figure 31 : la chryisine-7-gluc dans le site actif de la bêtalactamase.....	38
Figure 32 : la chryisine-7-gluc avec quelques résidus de la bêtalactamase.....	38
Figure 33 : la chryisine-7-glc dans le site actif de la bêtalactamase.....	39
Figure 34 : la chryisine-7-glc avec quelques résidus de la bêtalactamase.....	39

Liste des abréviations

ADN: Acide désoxyribonucléique

Api : Apigénine

Api-7-OCH₃: Apigénine-7-OCH₃

Api-7-gluc: Apigénine-7-glucuronide

Api-7-glc: Apigénine-7-glucoside

ARN: Acide ribonucléique

ARNm: Acide ribonucléique messenger

ARNr: Acide ribonucléique ribosomal

ARNt: Acide ribonucléique de transfert

C+G%: Pourcentage en guanine + cytosine du génome (anciennement coefficient de Chagraff)

Cap : Captopril

Car : Carbapénème

Chr: Chrysine

Chr-7-OCH₃: Chrysine-7-OCH₃

Chr-7-gluc: Chrysine-7-glucuronide

Chr-7-glc: Chrysine-7-glucoside

CHU : Centre hospitalo-universitaire

CMI : Concentration minimal inhibitrice

DMSO : Diméthylsulfoxyde

EC : Eucalyptus

Kb: Kilo base

Lut: Lutéoline

OR: Origan

Pb: Paire de bases

PDB : Proteins Data Bank

ROM: Romarin

RMSD: Root mean square deviation

ssp: Sous espèce

Introduction générale

Les infections microbiennes occupent actuellement la première place en pathologie humaine. Connues depuis longtemps, elles (infections nosocomiales, urinaires...) ont progressivement changé de visage mettant la clinique face à une situation d'impasse thérapeutique (**Cornaglia et al, 2011**).

En effet, du fait de l'évolution des systèmes de soins, les cliniciens se retrouvent confrontés à des infections à germes autrefois réputés non pathogènes ou saprophytes, ainsi l'épidémie de la multirésistance aux antimicrobiens est devenue un enjeu de santé publique qui interpelle les experts de tout bord à tirer la sonnette d'alarme afin de mettre au point de nouvelles stratégies pour éviter la propagation de ces germes.

L'un des exemples le plus frappant pour illustrer ce propos reste *Klebsiella pneumoniae*.

Durant ces dernières décennies cette entérobactérie requière une attention particulière lors de la prise en charge d'infections sévères (pneumonies mortelles, bactériémies...) en raison de l'émergence constante de résistance chez cette espèce reconnue comme étant le chef de file de la propagation de multirésistance entre pathogènes à Gram négatif (**Tumbarello et al, 2007**).

Vu que les bactéries développent en continue de la résistance aux produits synthétiques (antibiotiques et composés chimiques) et pour échapper à une situation d'impasse clinique la recherche de nouveaux inhibiteurs antimicrobiens appropriés s'est tournée vers de nouvelles voies parmi lesquelles l'utilisation de composés naturels comme sources de remèdes efficaces.

Parmi le grand nombre de molécules naturelles susceptibles de constituer des alternatives aux médicaments, les flavonoïdes seraient des prétendants éventuels pour jouer le rôle d'inhibiteurs de *Klebsiella pneumoniae*.

C'est dans ce contexte que se situe notre travail qui a pour objectif de tester l'efficacité des flavonoïdes *in silico* et *in vitro* vis-à-vis de *Klebsiella pneumoniae*

Le présent mémoire comporte trois parties :

Le premier chapitre est présenté sous forme d'une revue bibliographique consacrée à la présentation, la caractérisation bactériologique et génomique et l'inhibition de *Klebsiella pneumoniae*.

Le deuxième chapitre est consacré à une présentation des flavonoïdes, composés issus du métabolisme secondaire des plantes : leur structure, leur classification et leurs propriétés biologiques.

La dernière partie sera consacrée à l'étude *in silico* et *in vitro* de l'inhibition de *Klebsiella pneumoniae* par les flavonoïdes.

Pour réaliser cette étude *in silico*, le docking moléculaire sera utilisé. Pour cela nous sommes tournées vers les approches de la modélisation.

In silico, le docking moléculaire, vise à prédire la formation du complexe le plus stable résultant de la protéine et du ligand pris séparément. L'avantage essentiel de cette approche est de mettre en évidence les propriétés structurales et énergétiques de l'architecture moléculaire ainsi constituée.

L'étude *in vitro* consiste à tester l'efficacité des extraits de trois plantes (l'**eucalyptus**, l'**origan** et le **Romarin**) par la méthode de diffusion sur milieux de culture vis-à-vis de *Klebsiella pneumoniae*.

Toute notre recherche et nos calculs ont été réalisés au sein du **Laboratoire de Chimie des Matériaux Constantine (LCMC)** en contribution avec les **Laboratoires de Bactériologie** du **CHU Benbadis** et de l'hôpital El Bir, **Constantine**.

Chapitre I :
Klebsiella pneumoniae
et sa résistance

I.1. Généralités

Klebsiella pneumoniae (*Kp*) connue autre fois sous le nom de pneumobacille de Frienlander fut découverte pour la première fois dans les poumons d'un patient décédé d'une pneumonie (Freney et al, 2000).

Klebsiella pneumoniae est un germe opportuniste du tube digestif de l'homme. Ce microorganisme à fort potentiel épidémique, est fréquemment impliqué dans des infections sévères et difficiles à traiter principalement respiratoires et urinaires (Nordmann et al, 2009).

I.1.1. Description

L'espèce *Kp* est une bactérie à Gram négatif de 0.3 à 1 µm de diamètre et de 0.6 à 6 µm de longueur. C'est un diplobacille immobile généralement capsulé non sporulé. Ayant un métabolisme respiratoire et fermentatif, *Kp* est aéro-anaérofacsultative (Srinivasan et al, 2012).

I.1.2. Taxonomie

Le genre *Klebsiella* ou Klebsielles, nommé par Trevsian en 1887 pour honorer le microbiologiste Allemand du 19^{ème} siècle Klebs Edwin comporte 5 espèces dont l'espèce type est *Klebsiella pneumoniae* (George et al, 2004).

Règne : *Bacteria*

Embranchement : *Proeobactéria*

Classe : *Gamma Proteobacteria*

Ordre : *Enterobacteriales*

Famille : *Enterobacteriaceae*

Genre : *Klebsiella*

Espèce : *Klebsiella pneumoniae*

Kp est subdivisée en 3 sous-espèces :

-*K pneumoniae ssp pneumoniae*

-*K pneumoniae ssp ozaenae*

-*K pneumoniae ssp rhinoscleromatis*

I.1.3. Réservoirs de *Kp*

Kp est une espèce ubiquitaire fréquemment isolée des eaux usées, des eaux de surfaces, du sol, du bois, des efflux industriels, des animaux à sang chaud et divers végétaux.

Chez l'homme cette espèce végète sur la peau, les muqueuses, les voies respiratoires supérieures et elle est isolée des excréments de 30 % des individus (Joly et al, 2002).

I.1.4. Transmission

Kp se propage de manière épidémique et elle est responsable de 25% des cas d'infections spontanées, mais surtout les infections nosocomiales. Dans ce dernier cas, elle est transmise par la manipulation de matériel souillé (cathéter, masque à oxygène...), par les mains sales, souvent par voie féco-orale d'où l'importance des mesures d'hygiène (Kariukiet al, 2007).

I.2. Caractères bactériologiques

Kp présente tous les caractères généraux des entérobactéries :

I.2.1. Caractères enzymatiques et biochimiques

Les principaux caractères enzymatiques et biochimiques de *Kp* sont résumés dans le **Tableau 01** :

Réactifs	Résultats	Réactifs	Résultats
ONPG, KCN	+	ODC	-
H ₂ S, désaminase, IND	-	ADH	-
VP	+	Rhamnose	+
RM	-	Arabinose	+
Uréase	+/-	Raffinose	+
Citrate de Simmons	+	Gélatinase	-
LDC	+	Lipase, Dnase	-

Tableau 01 : Principaux caractères enzymatiques et biochimiques de l'espèce *Kp* (Le Minor et Véron, 1989) :

(+) : réaction positive ; (-) : réaction négative ; **ADH**: Arginine déshydroxylase ; **LDC**: Lysine décarboxylase ; **RM**: Réaction au rouge de Méthyle ; **ODC**: Ornithine décarboxylase ; **VP**: Réaction de Voges-Proskauer ; **IND**: Indole ; **H₂S**: sulfure d'hydrogène.

I.2.2. Caractères antigéniques

Du fait de son immobilité, *Kp* partage tous les antigènes communs aux entérobactéries excepté l'antigène flagellaire.

I.2.2.1. Organisation génomique

Selon **Bi D** et ses collaborateurs la constitution génomique générale de *Kp* serait la suivante :

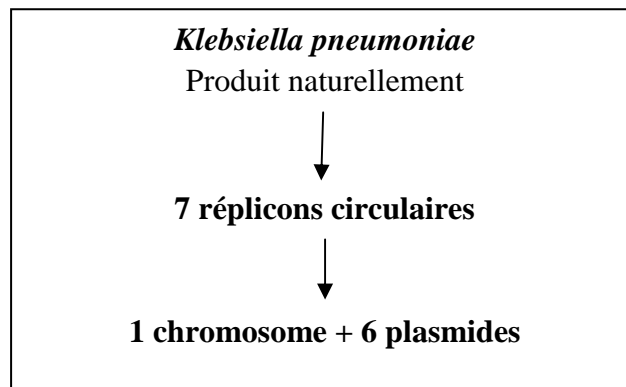


Figure 01 : schéma général de l'organisation génomique de *Kp* (Bi D et al, 2012)

L'organisation génomique est commune à toutes les *Kp* (**Figure 01**) mais certaines souches sont caractérisées par des éléments très spécifiques à titre d'exemple la souche HS1128 qui se distingue par :

- Un chromosome de **5 332 752 pb** codant **5316** protéines putatives, **1** ARNm ; **87** ARNt; **8** copies de **16S,23S,5S** ARNr. Viennent s'ajouter à tout cela deux éléments spécifiques d'intégration et de conjugaison, l'***asn*** ARNt associé au gène **ICE*Kpn*HSd11286-1** et le ***phe*** ARNt associé au gène **ICE*Kpn*HS11286-2**. Ces deux entités jouent un rôle important dans l'acquisition et la dissémination de la résistance de cette souche.
- **422** gènes spécifiques codant six plasmides consécutifs regroupés dans le **Tableau 02** :

Plasmides	Nombre de Pb	G+C%
pKPHS 1	122 799	49,5
pKPHS 2	111 195	53,3
pKPHS 3	105 974	52,5
pKPHS 4	3751	52,2
pKPHS 5	3353	42,8
pKPHS 6	1308	47,9

Tableau 02 : Les six plasmides contenus dans le génome de *Kp* HS1128 (Jiang et al, 2010) : **pKPHS 1** comporte des gènes codant un spectre étendu de bêtalactamase CTX-M-14 ; **pKPHS 2** porte *lebla*TEM-1 et *lebla*KPC-2 du gène carbapénème ; **pKPHS 3** porte 13 déterminants importants de résistance (*tetG*, *cat*, *sul1*, *dfra12*, *aac3-Ia* et *aph* similaire à celui porté par *Yersinia pestis*) ; **pKPHS 4, 5** et **6** portent des protéines de fonctions inconnues actuellement.

Il est à remarquer que les gènes de transfert et de conjugaison tels que *tra* dans *pKPHS2* et *pKPHS3* peuvent conduire à la propagation de la multirésistance entre les différents genres. Certaines souches de *Kp pneumoniae* et de *Kp oxytoca* peuvent héberger des plasmides codant des gènes *nif* leur permettant de fixer l'azote atmosphérique. Ces plasmides sont parfois transférés aux souches d'*Escherichia coli* (Jiang et al, 2010).

I.2.2.2. Comparaison entre deux souches de *Kp*

Kp se caractérise par une extrême plasticité génomique qui lui confère l'aptitude à s'adapter, donc à survivre. En effet, un vaste répertoire de facteurs de virulence et de résistance est présent dans les génomes des souches de cette entérobactérie (Zhang et al, 2011).

Pour illustrer ces propos, nous comparons les différences et les similitudes de deux souches : la **NTUH-2044** et la **MGH78578**, isolées au Taiwan, la première du sang d'un patient touché d'une méningite métastatique et la seconde des urines d'un malade atteint d'une pneumonie. Les données recueillies (Keh-Ming Wu et al, 2009), sont regroupées dans le **Tableau 03** :

Eléments transposables et conjugatifs							
	ICE <i>Kp1</i>	Opéron <i>vag CD</i>	<i>Iro</i> <i>NBCD</i>	Gène <i>rmpA</i>	Pil X	Plasmide de mobilité	Fermentation du citrate
NTUH- 2044	1	1	1	1	1	1	0
MGH 78578	0	0	0	0	0	0	1

	Protéines membranaires			Mutation
	LPS	CPS	Adhésines	GyrA
NTUH- 2044	1	1	1	<i>tyr</i>
MGH 78578	1	1	1	<i>ser83</i>

Tableau 03 : Différences et similarités de gènes entre les souches NTUH-2044 et MGH 78578 (Keh-Ming Wu et al, 2009) : 1 : présence du gène ; 0 : absence du gène ; ICE*Kp1* : gène d'organisation génomique ; Opéron *vag CD* : gène de virulence ; *Iro NBCD* : sidérophores ; Gène *rmpA* : régulateur du phénotype ; Pil X : élément de sécrétion ; LPS : lipopolysaccharide ; CPS : polysaccharide capsulaire ; GyrA : ADN gyrase A ; *tyr* : tyrosine ; *ser83* : sérine83.

La comparaison des séquences génomiques soutient l'idée que l'insertion d'un gène entraîne la délétion d'un autre, ce qui est le cas pour le gène *tyr* qui, remplacé par le gène *ser83* dans la **GyrA** confère à la souche **MGH 78578** un niveau de résistance et de virulence plus élevé.

I.3.Pouvoir pathogène

Kp est considérée comme étant le chef de file des germes responsables d'infections nosocomiales généralement les pneumonies mortelles, les septicémies et les infections urinaires (Hennequin et al, 2012).

I.3.1. Facteurs de pathogénicité /virulence

La pathogénicité, notion qualitative, est l'aptitude d'une bactérie à déclencher une infection, alors que la virulence (notion quantitative) représente sa capacité à multiplier et développer la maladie malgré le système de défense de l'hôte.

Ainsi pour un même pouvoir pathogène, il peut exister différents degrés de virulence.

Les deux reposent sur plusieurs facteurs parmi les quels:

-a- Les antigènes de surface : *Kp* exprime généralement deux antigènes de surface :

- **Le lipopolysaccharide LPS** : Le LPS est formé de plusieurs composés jouant un rôle principal *in vivo* dans la protection de *Kp* contre le pouvoir bactéricide du sérum (Yeh et al, 2007), parmi eux se trouvent l'**antigène O** et le **lipide A**. Le premier est le composé le plus externe du LPS, il est constitué d'unités répétées de polymères d'oligosaccharides dont 9 types ont été identifiés. Le second correspond à l'endotoxine des bactéries à Gram négatif, il participe au pouvoir pathogène et sa libération massive dans la circulation au cours des bactériémies conduit au choc endotoxinique.
- **La capsule (Chuang et al, 2006)** : La majorité des souches de *Kp* produisent une capsule de nature polysaccharidique, formée essentiellement de l'**antigène capsulaire K**. Elle donne aux colonies sur gélose une apparence plus ou moins muqueuse caractéristique et apparaissant à la coloration de Gram sous la forme d'un halo clair. Sur les 82 antigènes capsulaires, 77 constituent une base de reconnaissance internationale.

Grâce à sa structure fibrillaire, la capsule couvre la surface bactérienne d'une couche épaisse et dense permettant ainsi à la bactérie de se protéger contre le système immunitaire de l'hôte. En effet, (de la phagocytose par les polynucléaires neutrophiles d'une part et de l'effet bactéricide des facteurs sériques d'une autre part).

En pathologie humaine, les souches de sérotype *K1*, et *K2* comprenant les deux gènes *magA* et *rmpA* sont actuellement considérées comme étant les plus virulentes.

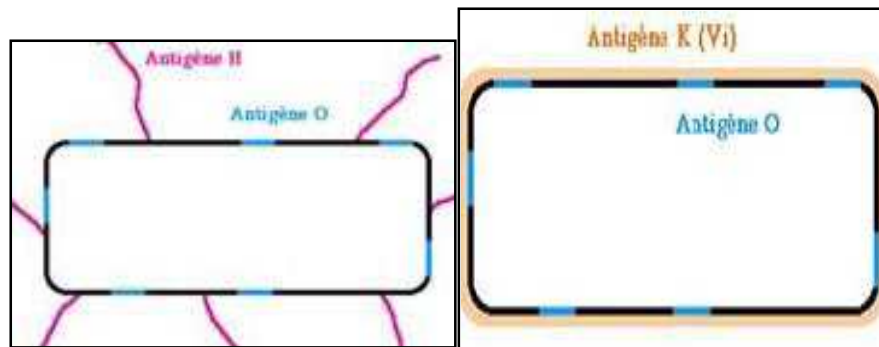


Figure 02 : Schéma représentant les différents antigènes (K, O, H) des Entérobactéries (Yeh et al, 2007)

- **β -Les adhésines** sont des molécules qui jouent un rôle essentiel dans la première étape du processus infectieux. Ce sont des structures protéiques filamenteuses et non flagellaires formant des appendices à la surface des bactéries. Elles permettent à ces dernières un rapprochement étroit puis la fixation aux cellules hôtes (**Hennequin et al, 2007**).

Les deux types les plus rencontrés chez *Kp* sont :

- **Le type 1**, le mieux connu, est présent chez la majorité des entérobactéries. Doté d'une grande capacité d'adhésion, il est impliqué dans la colonisation des tractus respiratoires et urinaires.
- **Le type 3**, dont le rôle comme facteur de virulence reste hypothétique dans plusieurs modèles d'infections, il s'engage dans l'adhésion de *Kp* à différents types cellulaires, épithéliums urinaires et respiratoires par exemple.

- **γ -Les Sidérophores** sont des structures particulières conférant à la bactérie la possibilité de capter le fer environnant essentiel à sa croissance et à sa réplication *in vivo*. Elles contribuent également à l'installation, la progression et la dissémination de l'infection.

Les gènes codant ces structures sont portés par un fragment d'ADN chromosomique de 35 à 45 Kb flanqué de séquences répétées. Celui-ci s'insère au niveau de la terminaison 3' du gène de l'ARNt avec un taux de G+C différent de celui du reste du chromosome (**Fang et al, 2004**).

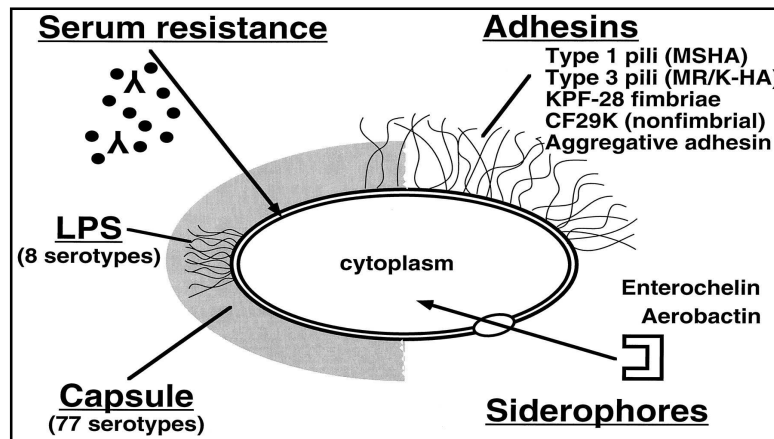


Figure 03: Représentation schématique des facteurs de pathogénicité et de virulence de *Kp* (Podschun et al, 1998)

I.4. Inhibiteurs de *Klebsiella pneumoniae*

Les inhibiteurs de *Kp* se subdivisent en 2 catégories : des inhibiteurs de synthèse (antibiotiques) et des inhibiteurs naturels (flavonoïdes, tannins, huiles essentielles...etc.).

I.4.1. Les inhibiteurs de synthèse (antibiotiques)

Les antibiotiques sont les seuls produits de synthèse utilisés dans l'inhibition de *Kp*.

Ce sont des composés issus de synthèse et/ou semi-synthèse possédant une activité métabolique antibactérienne à faible concentration et n'ayant pas de toxicité pour l'hôte (Silveret al, 2007).

I.4.1.1. *Klebsiella pneumoniae*/antibiotiques (Doi et al, 2014).

Même si *Kp* reste sensible aux produits actifs sur les bactéries à Gram négatifs, cette espèce peut présenter une multirésistance à l'ensemble des antibiotiques utilisés en thérapie clinique.

➤ Résistance naturelle

Klebsiella pneumoniae est naturellement résistante à l'ensemble des bêta-lactamines (l'aminopénicilline : l'ampicilline, l'amoxicilline et à la carboxypénicilline : la carbénicilline, la ticarcilline) par production d'une bêtalactamase de classe A d'espèce chromosomique appelée K2. Celle-ci peut être inhibée par l'acide clavulanique.

➤ Résistance acquise

De nombreuses souches de *Klebsiella pneumoniae* produisent des bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE) et parfois même des bêta-lactamases plasmidiques qui dérivent des céphalosporinases chromosomiques. Cette production résulterait probablement du transfert de gènes de résistance entre espèces (conjugaison, transformation et transduction).

La résistance aux céfépime, cefpirome ainsi qu'à l'imipenème est récemment décrite chez cette espèce, elle est probablement due à l'association d'une imperméabilité de la membrane externe et à une production de haut niveau d'une bêta-lactamase plasmidique.

Les données recueillies d'une étude qui a portée sur 142 cas d'ECBU (examen cytobactériologique d'urine) atteints de pneumonie dues à des *Kp* révèlent le profil suivant :

Familles	Antibiotiques	Interprétation	
		Résistance	Sensibilité
Bêta-lactamines	Amoxicilline	100%	0%
	Amoxicilline + acide clavulanique	100%	0%
	Ticarcilline	100%	0%
	Céfazoline	100	0%
	Céfotaxime	0%	100%
	Imipenème	0%	100%
Quinolones	Acide nalidixique	0%	100%
	Ciprofloxacine	0%	100%
Aminosides	Amikacine	0%	100%
Aminosides	Gentamicine haute charge	0%	100%
Polymyxines	Colistine	0%	100%
Mixte entre sulfamides et diaminopyrimidine	Cotrimoxazole	0%	100%
		100%	0%

Tableau 04 : Profil de résistance et sensibilité de *Kp* aux antibiotiques (Hamdan et al, 2011)

L'exploitation des génomes complètement séquencés de plusieurs souches de *Kp* sera utile pour révéler les rôles clés des éléments génétiques mobiles dans l'évolution adaptative et la propagation de la multirésistance chez cette espèce.

En effet, les résultats obtenus à partir d'une étude de 200 cas de *Kp* multirésistante ont dévoilé que la majorité des mutations touchant le génome sont subies par la Ser₈₃ et l'Asp₈₇ codons du gène *gyrA*. Les plus fréquentes sont regroupées dans le **Tableau 05** :

Codons altérés	Mutations fréquentes	Substitutions	Substitutions %	Taux de mutations
Ser ₈₃	S→F	TCC→ TTC	33	42
	S→Y	TCC→ TAC	20	25
	S→I	TCC→ ATC	16	20
		TCC→ ATA		
	S→L	TCC→ CTT	10	13
TCC→ CTC				
TCC→ CTA				
S→T	TCC→ ACT	1	2	
	TCC→ ACC			
Asp ₈₇	D→N	GAC→ GCC	25	31
		GAC→ GCT		
	D→A	GAC→ GCC	8	10
		GAC→ GCT		
	D→G	GAC→ GGC	4	8
GAC→ GGT				
D→Y	GAC→ TAC	4	5	
D→H	GAC→ CAC	2	3	

Tableau 05 : Distribution des mutations altérant le gène *gyrA* (Heiat et al, 2014) :

Asp₈₇: asparagine 87 ; Ser₈₃: serine 83 ;**F**: Phénylalanine, **Y**: tyrosine ;**I**: isoleucine ;**L**: leucine, **T**: thréonine ; **N**: asparagine ;**A**: alanine ;**G**: glycine ;**H**: histidine ;**S**: serine ;**D**: acide aspartique ;
A : adénine ; G : guanine ; T : thymine ; C : cytosine.

I.4.1.2. Les inhibiteurs naturels

Les antibiotiques ont permis le recul considérable de la mortalité associée aux maladies infectieuses au cours du 20ème siècle mais leur utilisation massive et répétée a conduit à l'apparition de bactéries résistantes. Ces résistances sont devenues préoccupantes et ont conduit les chercheurs à mettre en place des stratégies telles que l'utilisation des extraits de plantes comme remède pour éviter les situations d'impasses thérapeutiques.

Parmi le grand nombre de composés issus du métabolisme secondaire des plantes, les flavonoïdes seraient des candidats potentiels pour jouer le rôle d'alternative.

Chapitre II :

Les flavonoïdes

II.1. Introduction

Les flavonoïdes proviennent du métabolisme secondaire des végétaux. Ce sont des molécules organiques non directement impliquées dans le développement ou la reproduction de la plante. Leur absence n'entraîne pas une mort immédiate mais peut limiter la survie, la fécondité ou l'apparence d'un organisme. Cette absence peut aussi n'avoir aucun effet (**Ramakrishna et al, 2011**).

L'appellation « flavonoïde » rassemble une très large gamme de composés polyphénoliques formés par un squelette de base de 15 atomes de carbones. Ces composés représentent le groupe phénolique le plus diversifié : plus de 9000 flavonoïdes ont déjà été identifiés (**Hernández et al, 2009**).

II.2. Structure et classification des flavonoïdes

Les flavonoïdes comptent parmi les composés phytochimiques d'importance de notre alimentation (**Surh, 2003**). Ces molécules sont constituées de deux noyaux benzéniques (A et B) reliés par un noyau pyrane contenant un oxygène (C) (**Figure 04**).

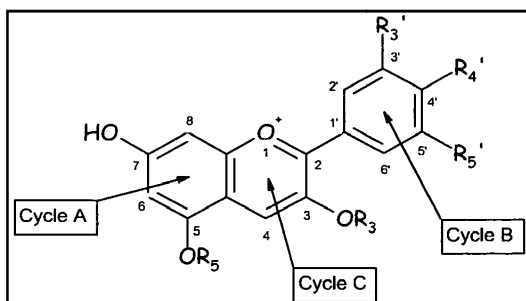


Figure 04 : Structure de base des flavonoïdes (Surh, 2003)

Les flavonoïdes pourvus d'un groupe hydroxyle en position C-3 sont classifiés en tant que 3-hydroxyflavonoïdes (flavonols, anthocyanes, catéchines), tandis que ceux ne le possédant pas sont classés en tant que 3-désoxyflavonoïdes (flavanones et flavones).

La classification à l'intérieur de ces deux familles est basée sur la présence ou non de groupes hydroxyle et méthyle additionnels ainsi que la position où ceux-ci ont été insérés dans le squelette de base. À l'exception de ces deux familles, le noyau B des isoflavonoïdes est lié au noyau C en C-3 plutôt qu'en C-2, faisant d'eux une catégorie à part. (**Erlund, 2004**).

II.2.1. Biosynthèse des flavonoïdes

Les flavonoïdes possèdent un squelette de base à 15 atomes de carbone. Ce dernier est constitué de deux cycles en C6 (A et B) reliés par une chaîne en C3, on parle alors de chalcones. Ces dernières représentent le précurseur commun de tous les autres flavonoïdes (Lu MF et al, 2013).

Toutes les voies métaboliques intervenant dans la biosynthèse des flavonoïdes peuvent être simplifiées comme s'est schématisé dans la **Figure 05** :

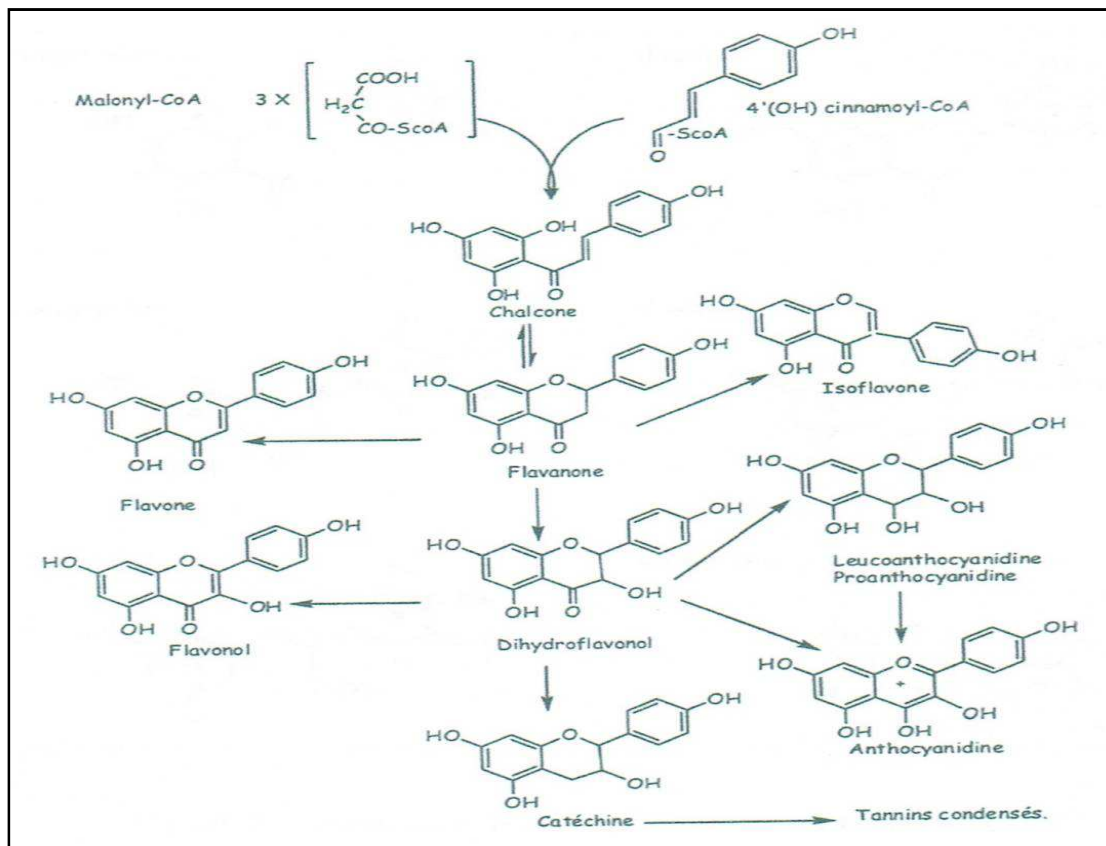


Figure 05 : Schéma simplifié de la biosynthèse des flavonoïdes (Morreel et al 2006)

II.3. Distribution et localisation :

Selon le type de l'espèce, les flavonoïdes sont présents dans différentes parties des végétaux supérieurs : racines, tiges, feuilles, fleurs, pollen, fruits, graines, bois... etc. Aussi, ils varient quantitativement et qualitativement selon le stade de développement du végétal (Sharma, 2006).

Flavonoïdes	Aliments
Flavonols	Oignon, Poireau, Brocolis, Pommes, Chou frisé, Thé.
Flavones	Persil, Céleri.
Flavanones	Fruits du genre citrus.
Isoflavones	Graines de soja et produits dérivés.
Flavan3-ols	Thé noir, thé vert, Cacao, Chocolat.
Anthocyanidines	Raisins, Certaines variétés de céréales.

Tableau 06 : Distribution des flavonoïdes dans quelques fruits et légumes (Hernández et al, 2009)

II.4. Propriétés des flavonoïdes

Les polyphénols et surtout les flavonoïdes sont des antioxydants puissants susceptibles d'inhiber les enzymes et de s'opposer à l'oxydation des macromolécules (**Cushnie et al, 2011**). En effet, les flavonoïdes sont des piègeurs efficaces des radicaux libres les plus prooxydants, particulièrement impliqués dans la peroxydation lipidique. Ils formeraient des espèces radicalaires intermédiaires peu réactives. De plus, ils ont une activité chélatrice des métaux tels que le cuivre et le fer qui, à l'état libre, peuvent être à l'origine de la production de radicaux libres. Les flavonoïdes peuvent également être de puissants inhibiteurs de l'oxydation de LDL (**Lu MF et al, 2013**).

De ce fait différentes propriétés leur sont reconnues parmi lesquelles :

- Anti-inflammatoires, immunologiques et hépato protectrices (**Sankaranarayanan et al, 2010**).
- Antifongiques, analgésiques et antiallergiques (**Friedman et al, 2007**).
- Antivirales (**Du et al, 2011**).
- Antiulcéreuses et anti cancérigènes (**Hang et al, 2002**).
- Antidiabétiques et anti cardiovasculaires (**Neto et al, 2007**).
- Antinéoplasique (**Cushnie et al, 2011**).

II.4.1. L'activité antimicrobienne des flavonoïdes

Les flavonoïdes ont une activité antibactérienne très vaste et très diversifiée. Ils s'attaquent à un grand nombre de bactéries avec une intensité différente selon le microorganisme et

l'écosystème dans lequel il se trouve (**Pistelli et al, 2012**). Aussi sont-ils utilisés *in vitro* comme des agents antimicrobiens (**Mishra et al, 2013**).

Dans de nombreux cas, il est admis que les flavonoïdes peuvent agir en synergie, en créant un environnement inhibiteur à l'invasion microbienne. Les combinaisons de flavonoïdes telles que quercétine/morine, quercétine/quercitrine ou rutine/quercétine permettent d'accroître l'activité antibactérienne sur *Salmonella enteritidis* et *Bacillus cereus* comparées à celle de chaque composé pris séparément (**Arima et al, 2002**). Isolés de la réglisse (*Glycyrrhizaglabra*), les trois flavonoïdes (licochalcone A, licoricidine et gancaonine) exercent une activité contre des souches de *Staphylococcus aureus* sensibles ou résistantes à la méthicilline (**Fukai et al, 2002**).

Lai et ses collaborateurs ont démontré que les deux flavones, la 5,7-dihydroxy- 4',6 ,8 - triméthoxyflavone et la 5,6 dihydroxy- 4',7, 8 triméthoxyflavone, peuvent être utilisées à la fois comme conservateurs alimentaires et comme agents thérapeutiques possibles contre l'infection microbienne (**Lai et al, 2004**). La catéchine et ses dérivés possèdent des propriétés antibactériennes clairement démontrées (**Veluri et al, 2004**), alors que leurs propriétés fongicides semblent plus controversées (**Cristobal et al, 2004**).

Le composé 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-4,6-dihydroxy-2-methoxybenzofuran-3-one, un dérivé de la quercétine isolé à partir de l'extrait aqueux de la pelure d'oignon, inhibe sélectivement la croissance des bactéries Gram-négatif (100 µg/ml, zone d'inhibition 12–15mm) essentiellement les souches de *Helicobacter pylori*, cependant quand il s'agit de pathogènes Gram-positif, il reste inactif (**Ramos et al, 2006**).

Lee et son équipe ont étudié le potentiel antimicrobien de la 3,6 dihydroxyflavone et le dérivé de la chalcone : les deux composés se sont avérés être de puissants inhibiteurs de la B-Ketoacyl-acyl porteuse d'une protéine synthase III (kas III) et ils affichent également un excellent effet antimicrobien contre *Staphylococcus aureus* avec des MCI variant de 8 à 32 µg/ml (**Lee et al. 2009**).

Certains flavonoïdes communs, tels que la lutéoline, la quercétine, l'apigénine, la kaempférol, l'isorhamnétine, acacétine, tamarixetine, chryisine et galangine ou leurs hétérosides, sont reconnus posséder des propriétés antimicrobiennes (**Elhissi et al, 2011**).

II.5. *Klebsiella pneumoniae*- flavonoïdes

D'après Pandey et son équipe, la lutéoline inhibe la croissance de l'organisme *Staphylococcus aureus* à gram positif et de *Klebsiella pneumoniae* à gram négatif avec une valeur de la CMI allant de 100 à 6,25 µg /ml (**Pandey et al, 2004**).

Le dihydrokaempférol et la 8-C-glucopyranosylapigénine isolés à partir de l'extrait de *Trilepsium madagascariense* ont présenté une activité antimicrobienne contre *Providencia smartii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Clostridium albicans*. Les différentes valeurs de leur CMI varient entre 8 et 32µg /ml (**Rukholm et al, 2006**).

Chapitre III : Etude *in vitro*
***Klebsiella pneumoniae*/Flavonoïdes**

L'étude de l'activité antibactérienne des extraits méthanoliques de nos trois plantes : *Eucalyptus globulus*, *Origanum vulgare* et *Rosmarinus officinalis* a été effectuée au laboratoire de bactériologie de l'hôpital El Bir de Constantine.

III.1. Evaluation de l'activité antibactérienne et test de sensibilité.

L'inhibition de la croissance bactérienne est réalisée grâce à la méthode de diffusion par puits sur gélose. Utilisée en bactériologie médicale, cette technique sensible et facile à mettre en œuvre nécessite peu d'échantillon. Elle consiste à découper des trous circulaires de 2 mm de diamètre et de la hauteur de la gélose uniformémentensemencée avec une suspension de *Klebsiella pneumoniae*.

Les extraits à étudier sont versés dans les cavités ainsi formées. Après incubation, les colonies se développent à la surface de la gélose laissant des zones vierges autour des puits appelées zones d'inhibition. Le diamètre de ces dernières est proportionnel à l'activité bactériostatique de l'extrait sur la souche testée. Plus il est grand, plus la souche est dite sensible. Cette activité s'exprime directement par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition en millimètre (Berghe et al, 1991).

III.2. Matériel végétal

Pour le présent travail, sont employés comme matériel végétal : l'eucalyptus, l'origan et le romarin. L'eucalyptus et le romarin proviennent du campus ChaabatRassas, alors que l'origan vient de la région de Grarem. Les trois espèces ont été cueillies au mois d'avril.

III.2.1. L'*Eucalyptus globulus* (Myrtaceae) (الصنوبر)

L'**Eucalyptus commun** ou **Gommier bleu** (*Eucalyptus globulus*) est un arbre sempervirent (à feuillage persistant) de la famille des Myrtaceae. Il est largement cultivé et peut croître jusqu'à 30-55 m de haut.

Cet arbre est reconnu pour ses vertus médicinales et aromatiques. On lui prête des propriétés hypoglycémiantes, antiseptiques ou antibactériennes. Ses feuilles sont toujours utilisées en pharmacie (extrait liquide, teinture, essence) (Dubois et al, 2006).

III.2.2. *Origanum vulgare* (origan/زعرتر)

C'est une plante herbacée vivace de la famille des Lamiacées. La plante atteint généralement une taille variant de 30 à 80 cm. Les tiges rouges, à section carrée, sont velues avec des feuilles arrondies, vertes, légèrement dentées. Les fleurs sont roses ou pourpres, et sont regroupées en petites panicules.

L'**origan**, également **marjolaine sauvage** ou **marjolaine vivace**, est reconnue pour ses vertus médicinales et aromatiques. Antiseptique très puissant recommandée pour tout type de rhume ou grippe, elle est également un remède contre les douleurs spasmodiques, la fatigue et le stress. De même, en bains de bouche elle peut assainir la cavité buccale (**Dubois et al, 2006**). L'origan, une herbe aromatique de première importance doit ses propriétés biologiques et son pouvoir antibactérien, antifongique ou encore antioxydant à sa composition complexe constituée de diverse familles de composés issus du métabolisme secondaire (**Leite de Souza et al, 2009**).

En plus des huiles essentielles, les flavonoïdes sous forme d'aglycones ou d'hétérosides restent les entités les plus présentes. En effet, dans une revue bibliographique **Melpomene (2008)** a dénombré chez le genre *Origanum* plus de 25 flavonoïdes sous forme libre et appartenant à toutes les classes (flavanones, flavones, flavonols et dihydroflavonols). Parmi les quatre catégories, les flavones sont majoritaires ce qui est une caractéristique des *Lamiaceae*.

Flavones	Chrysine	5,7-Dihydroxyflavone
	Néglétine	5,6-Dihydroxy-7-méthoxyflavone
	Mosloflavone	5-Hydroxy-6,7-diméthoxyflavone
	Diosmétine	5,7, 3'-Trihydroxy-4'-méthoxyflavone
	Acacétine	5,7-Dihydroxy-4'-méthoxyflavone
	Lutéoline	5,7,3',4'-Tétrahydroxyflavone
	Apigénine	5,7,4'-Trihydroxyflavone
Flavonols	Kaempférol	3, 5, 7, 4'-Tetrahydroxyflavone
	Quercétine	3, 5, 7, 3', 4'-Pentahydroxyflavone

Tableau 07 : Liste de quelques flavonoïdes extraits du genre *Origanum* (adapté de chez Melpomene et al, 2008)

L'*Origanum vulgare* a été testée sur plusieurs bactéries Gram positif et Gram négatif (*Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, *Listeria monocytogenes*, *Kokuria kristinae*, *Micrococcus roseus*, *Pseudomonas aeruginosa*) et a démontré une forte activité inhibitrice et une efficacité antibactérienne prouvée (**Alexopoulos et al, 2011**).

III.2.1. Le *Rosmarinus officinalis* (le romarin/كليلج)

Le genre *Rosmarinus* appartient à la famille des *Lamiacées*. L'espèce appelée romarin est un arbrisseau qui peut atteindre jusqu'à 1,5 mètre de hauteur. Il est facilement reconnaissable en toute saison à ses feuilles persistantes sans pétiole, coriaces beaucoup plus longues que larges, aux bords légèrement enroulés, vert sombre luisant sur le dessus, blanchâtres en dessous.

Cette plante mellifère contenant plusieurs agents actifs est utilisée en phytothérapie pour son pouvoir cholérétique, hépatoprotecteur, antimycosique et surtout antibactérien (**Dubois et al, 2006**).

III.3. Les techniques d'extraction

Après séchage à l'air et à l'ombre, le matériel végétal est broyé. Les extraits des trois plantes sont obtenus par macération dans un mélange méthanol/eau (70/30). Plusieurs macérations sont nécessaires pour récupérer le maximum de composés naturels. Les différents extraits sont réunis et évaporés à sec à l'aide d'un rotavapor à 40°C.

Leur poids respectif exprimé en mg est de :

Eucalyptus	Origan	Romarin
5,6918	2,3719	0,4285

Pour la suite de notre travail, les extraits méthanoliques sont solubilisés dans le DMSO. Tous les échantillons seront conservés au réfrigérateur à 4°C.

Avant la réalisation des tests antibactériens des solutions à différente dilution sont préparées.

Tableau 08 : Concentrations exprimées en mg/ml des différents échantillons testés avec *Kp*

Eucalyptus		Origan		Romarin	
EC1	0,37945	OR1	0,1186	ROM1	0,04285
EC2	0,18973	OR2	0,0593	ROM2	0,02143

III.4. Matériel bactériologique

La souche testée provient du laboratoire de bactériologie du CHU Ben Badis de Constantine. Elle a été isolée à partir des urines d'un patient.

Deux milieux de culture sont utilisés : les géloses M-H (Mueller-Hinton) et l'Hektoen. La première est un milieu non sélectif pour l'étude de la sensibilité ou la résistance des germes pathogènes, le second est un milieu sélectif permettant l'isolement et la différenciation des entérobactéries pathogènes.

III.4.1. La préparation des souches

Les géloses M-H et Hektoen sont coulées chacune dans 6 boîtes de pétri sur une épaisseur de 8mm.

Une colonie de *Kp* est prélevée de la suspension bactérienne, déposée puis étalée uniformément à l'aide d'un écouvillon sur le milieu de culture dans chaque boîte de pétri. Cette dernière opération représente l'étape d'ensemencement.

Une pipette pasteur cotonnée, boutonnée, stérilisée est utilisée pour creuser des puits dans les différentes boîtes.

A l'aide d'une micropipette, 150 µl de chaque extrait sont déposés dans les trous.

Les boîtes sont refermées pour éviter la contamination. Elles sont laissées pendant 45 min à température ambiante sur la paillasse, pour une pré-incubation, ensuite elles sont incubées dans une étuve à 37°C pour une durée de 24 heures.

Dans ce test le DMSO représente le témoin négatif alors que le témoin positif sera l'ampicilline

Pour la fiabilité des résultats, chaque extrait est dupliqué.

III.5. Lecture et analyse

L'activité antibactérienne, quand elle existe, se manifeste par des zones d'inhibition autour des puits. Le diamètre de ces dernières est proportionnel à l'intensité de l'activité qui est évaluée par la mesure de la taille du halo d'inhibition de la croissance bactérienne autour des puits.

III.6. Résultats et discussions

Après une incubation de 24h, la lecture des résultats se fait par l'observation des boîtes à l'œil nu. Avec la gélose Hektoen, *Kp* forme des colonies jaune saumon.

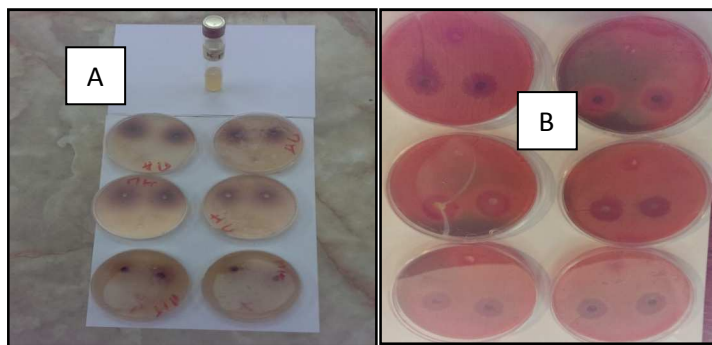


Figure 06 : Résultats obtenus après culture de 24h sur milieux M-H (A) et Hektoen (B)

Nous constatons que les trois extraits ont réagi avec la souche pathogène de *Kp*. Les zones d'inhibition sont bien visibles et leur mesure au pied à coulisse donne les valeurs consignées dans le **Tableau 09**.

Eucalyptus		Origan		Romarin		DMSO	Ampicilline
EC1	17,0	OR1	18,0	ROM1	19,0	0	10,70
EC2	17,0	OR2	20,0	ROM2	19,0		

Tableau 09 : Diamètre d'inhibition de la croissance De *Klebsiella pneumoniae* (en mm)

D'après les résultats du test de l'activité antibactérienne, il apparaît que chacune des trois plantes possède une activité assez bien définie sur la croissance de *Kp*.

Les diamètres d'inhibition varient d'un extrait à l'autre et la nature de la plante semble jouer un rôle sur la sensibilité de la bactérie.

En effet, dans cette série de trois plantes, pour la première concentration (la plus forte), le romarin se positionne en premier (19 mm) suivi de l'origan (18 mm). Pour la seconde (la plus faible), l'origan se place en tête avec sa zone d'inhibition la plus importante (20 mm), vient ensuite le romarin (19mm). L'eucalyptus (17 et 17 mm), dans les deux cas de figure, se classe en dernier.

L'activité de ces trois échantillons peut s'expliquer par le fait que les extraits méthanoliques contiennent un nombre considérable de molécules organiques provenant du métabolisme secondaire qui peuvent agir en synergie. Effectivement, l'extraction hydro-méthanolique entraîne des composés appartenant à diverses familles chimiques, parmi lesquelles, les flavonoïdes, les coumarines, les saponines reconnues pour leur pouvoir antibactérien.

III.7. Conclusion :

Au vu des valeurs des diamètres d'inhibition des 3 plantes et comparativement à l'ampicilline, les extraits méthanoliques de l'eucalyptus, de l'origan et du romarin sont considérés comme des entités possédant un effet antibactérien sur la souche étudiée de *Klebsiella pneumoniae*.

Chapitre IV : Etude *in silico*
***Klebsiella pneumoniae*/Flavonoïdes**

IV.1. Introduction

La recherche en biologie ne peut, actuellement, se passer des outils informatiques pour traiter le flot de données produites et optimiser ses avancées. La modélisation moléculaire, une de ces méthodes, exploite des lois de la chimie, de la physique et de la biologie afin de déterminer la structure et les propriétés d'entités chimiques et biochimiques (protéines, acides nucléiques, complexes moléculaires, solides, cristaux etc.).

Le but de cette approche est la compréhension ou la prédiction des phénomènes auxquels s'intéressent ces disciplines (**Leach et al, 2001**).

La modélisation moléculaire permet de représenter le comportement des systèmes complexes en simulant, à l'aide de fonctions mathématiques appropriées, les grandeurs réelles (**Bastard et al, 2005**).

Grâce à l'évolution de l'informatique, les méthodes pour modéliser le comportement d'une molécule et de son environnement se sont développées.

Utilisées dans le domaine du docking, ces applications permettent l'étude, au niveau atomique des interactions entre deux structures moléculaires. Elles visent la prédiction de l'agencement le plus probable de ces dernières en cherchant des orientations dans l'espace et des conformations qui favoriseraient la formation du complexe le plus stable (**Liotta et al, 1988 ; Toulhoat et al, 2007**).

IV.2. Docking moléculaire (Warren et al, 2006).

Identifier les interactions entre molécules, impliquées dans la plupart des processus biologiques, représente une étape importante dans la conception de composés pouvant être utilisés en thérapie. Ces informations s'obtiennent directement par le docking (ancrage ou amarrage).

Dans la majorité des cas, ce processus consiste à faire interagir deux molécules :

- un ligand, petite molécule organique flexible et
- un récepteur, généralement, une macromoléculaire de nature protéique possédant un ou plusieurs sites actifs spécifiques avec une structure tridimensionnelle connue.

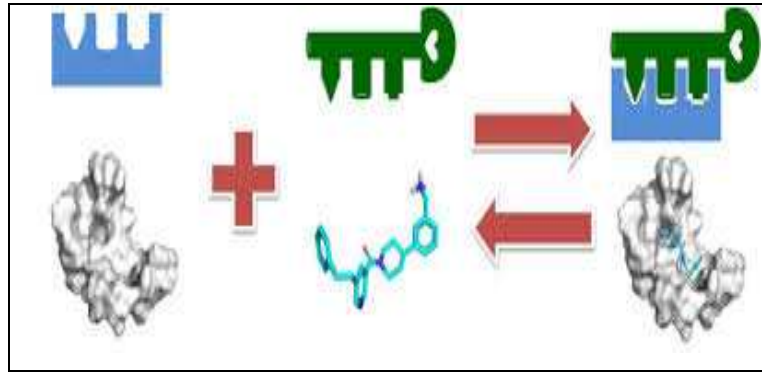


Figure 07 : Représentation schématique du docking moléculaire (Warren et al, 2006)

La plupart des programmes existants, essayent de déterminer la géométrie du complexe macromolécule-ligand. L'algorithme de base tient essentiellement en trois points :

- définir une géométrie du complexe
- évaluer la qualité de cette géométrie
- recommencer en classant les géométries

IV.2.1. Les interactions protéine-ligands

Le docking *in silico* rend possible l'identification des interactions qui existent dans la structure constituée à partir de la protéine et du ligand. La cohésion du complexe ainsi formé est assurée grâce à plusieurs types de liaisons faibles :

- **Les interactions de Van Der Walls** résultent de l'interaction des nuages électroniques de deux atomes adjacents conduisant à la présence d'une force attractive pour des distances de 3-4 Å. Les interactions de Van der Walls sont généralement faibles. Leur importance provient du nombre cumulé de liaisons créées.

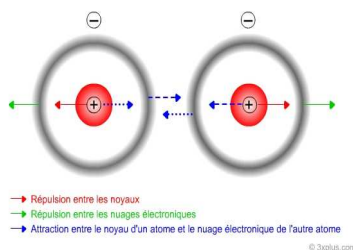


Figure 08 : Les interactions de Van Der Walls

- **Les liaisons hydrogène**, peu nombreuses, agissent à très courte distance (2,2 à 4 Å) et interviennent lorsqu'un atome d'hydrogène lié à un atome électronégatif (le donneur) est attiré par un autre atome électronégatif (l'accepteur).

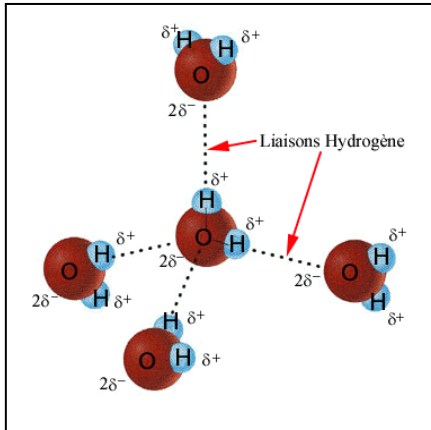


Figure 09 : schéma représentant les liaisons hydrogène

- **Les interactions hydrophobes** : Il s'agit d'interactions entre molécules dépourvues de groupes chargés ou d'atomes capables de former des liaisons hydrogènes. L'effet hydrophobe est la tendance qu'ont ces groupes à se rassembler par coalescence.

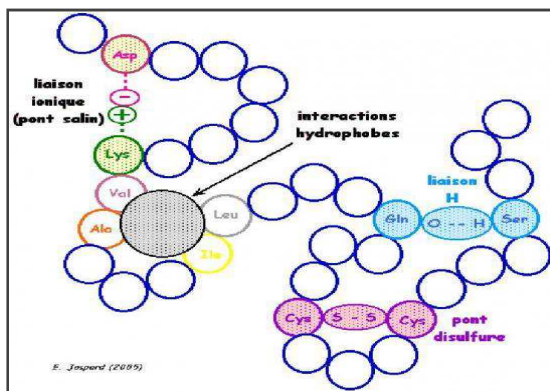


Figure 10 : Les interactions hydrophobes

- **Les interactions électrostatiques** sont des liaisons ioniques faibles résultant de l'interaction entre dipôles de charges opposées et conduisant à la création d'une force attractive.

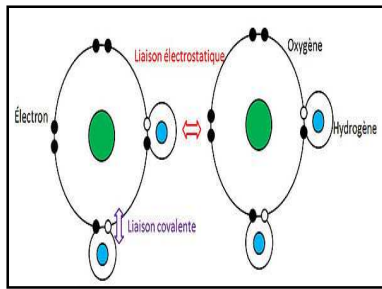


Figure 11 : Les interactions électrostatiques

IV.2.2. Les étapes du docking moléculaire

Tous les programmes de docking se décomposent en deux étapes :

- Etape 1: Searching
- Etape 2: Scoring

➤ Le searching

Il consiste à trouver les conformations du ligand apte à établir des interactions les plus probables avec le récepteur par un algorithme de recherche.

➤ Le scoring

Il représente l'évaluation des différentes conformations par des fonctions mathématiques appelées fonctions de score. Elles se basent sur un calcul rapide de l'énergie libre du système formé par la protéine et le ligand.

ArgusLab (<http://www.ArgusLab.com>) se base sur une description géométrique du système protéine-ligand. Le ligand flexible va subir plusieurs translations suivies de rotations pour trouver sa position optimale dans le site actif de la protéine qui est considéré rigide. Dans cette approche, l'évaluation de l'énergie du système protéine-ligand doit être calculée après chaque combinaison de translation-rotation du ligand.

Avec le code ArgusLab (Akifumiet al, 2009), les conformations sont classées selon leurs énergies croissantes par « Ascore » formulée à partir de l'équation suivante :

$$\Delta G_{\text{Liaison}} = \Delta G_{\text{vdw}} + \Delta G_{\text{hydrophobique}} + \Delta G_{\text{Liaison-H}} + \Delta G_{\text{déformation}} + \Delta G_0 \quad \text{où}$$

ΔG_{vdw} -----interactions de Van Der Walls entre le ligand et la protéine

$\Delta G_{\text{hydrophobique}}$ ----interactions hydrophobes

$\Delta G_{\text{Liaison-H}}$ -----liaisons hydrogène

$\Delta G_{\text{déformation}}$ -----pénalités de déformation

ΔG_0 ----- constante qui exprime la perte d'entropie due à la déformation du complexe

IV.3. Interactions flavonoïdes/4exs

La plupart des entérobactéries sont devenues résistantes à de nombreuses bêta-lactamines en raison d'une production de Bêta-Lactamases à Spectre Elargi (BLSE). La prévalence d'E-BLSE (Entérobactéries productrices de BLSE) augmente de manière inquiétante d'où l'intérêt des chercheurs pour les essais de molécules isolées des plantes.

Pour réaliser notre étude *in silico* notre choix s'est porté sur **NDM-1**(**New Delhi Métallo Bêtalactamase-1**) une enzyme du groupe BLSE qui confère aux bactéries qui la synthétisent une résistance à la majorité des antibiotiques y compris ceux de la famille des carbapénèmes, habituellement réservés au traitement des infections multi-résistantes (**Jiang et al, 2010**).

La **NDM-1** agit par inactivation enzymatique qui consiste en l'hydrolyse de sa cible, les bêtalactamines.

IV.3.1. Molécules impliquées dans le docking

IV.3.1.1. Structure de 4exs :

Un complexe expérimental (ligand/récepteur cristallisés) reste la meilleure méthode pour arriver au site actif de la macromolécule. Les coordonnées cristallographiques de plusieurs structure, tirées de la PDB¹, sont testées et celles qui correspondent le mieux aux critères (RMSD) sont celles de la **4exs**. Afin de confirmer le choix de 4exs dont la structure cristalline a été déterminée en 2012 (**King et al, 2012**), un redocking dans les mêmes conditions opératoires est refait pour le ligand natif de cette structure.

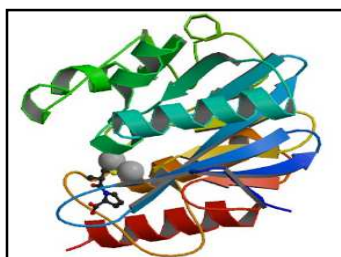


Figure 12 : NDM-1 complexée avec le L. captopril

¹ www.PDB.org

➤ **Les acides aminés du site actif (Aa) :**

L'identification des résidus d'acides aminés de l'entrée (4exs) est une étape primordiale dans le docking moléculaire.

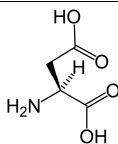
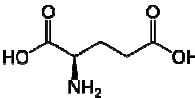
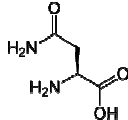
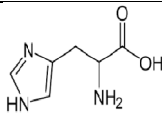
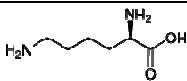
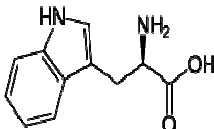
Nom	Aspartate	Glutamine	Asparagine
Structure			
Nom	Histidine	Lysine	Tryptophane
Structure			

Tableau 09 : Liste des acides aminés impliqués dans le site actif de 4exs

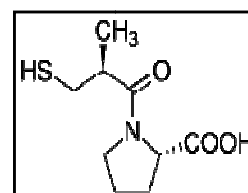
VI.3.1.2. Les ligands

Neuf flavonoïdes de type flavones (apigénine+ 3 dérivés ; chrysin+ 3 dérivés et lutéoline) serviront de ligands dans cette étude *in silico*. Le choix des molécules s'est basé sur les données de la littérature qui sont coordonnées aux résultats obtenus *in vitro*.

A) Captopril (ampicilline)

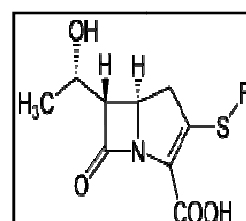
La molécule référence est un composé organique de synthèse.

C'est un antibiotique appartenant à la famille des bêta-lactamines. Il agit comme un inhibiteur irréversible de la transpeptidase, une enzyme indispensable aux bactéries pour la synthèse de leurs parois cellulaires conduisant ainsi à la mort de sa cible (Krzesinski et al, 2004).



B) Carbapénème

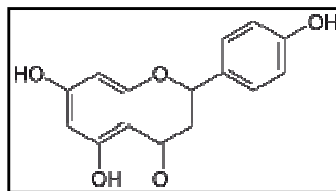
Jusqu'en 2012, les carbapénèmes représentaient la classe



d'antibiotiques ayant le plus large spectre d'activité en termes d'inhibition bactérienne. L'utilisation excessive de ces composés ainsi que l'évolution de la résistance bactérienne a fait de ces derniers une cible facilement hydrolysable par les bêtalactamases (**Hennequin et al, 2012**).

C) Apigénine

L'**apigénine** est un flavonoïde naturel présent dans les fruits et légumes ; persil, oignon, thé ou pamplemousse et dont l'une des sources les plus communes de sa consommation est la camomille (**Lu MF et al, 2013**). Il est reconnu comme une flavone bioactive possédant plusieurs propriétés:

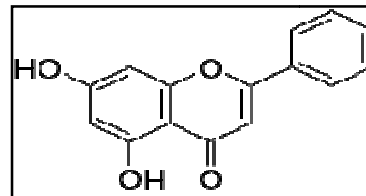


- anti-inflammatoires
- anticancéreuses
- anti-allergisantes
- antifongiques et surtout antibactériennes.

D) Chrysin

La **chrysin** (**Chr**) est un flavone naturellement présent dans les fruits et légumes, il est également retrouvé en petite quantité dans les rayons de ruche (**Leite de Souza et al, 2009**).

On lui attribue plusieurs propriétés biologiques :

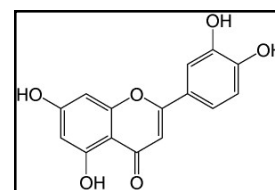


- Antifongiques
- Antioxydantes
- Antibactériennes ou encore anticancéreuses

E) Lutéoline

La **lutéoline** est l'une des flavones les plus communes, elle est principalement présente dans les feuilles de plantes (origan et romarin), mais aussi dans le céleri, le thym, le pissenlit, l'écorce de fruit ou d'arbre (**López-Lázaro, 2009**).

On prête à la lutéoline un grand rôle dans le corps humain :



- Un agent préventif d'inflammation
- Un antioxydant destructeur de radicaux libres
- Un régulateur du système immunitaire
- Un inhibiteur antibactérien

IV.4. Interactions flavones/4exs

IV.4.1. Calcul de ΔG

Les énergies libres de formation des différents complexes entre les flavones et l'enzyme 4exs sont obtenues grâce au logiciel libre ArgusLab 4.01. Les résultats sont présentés dans le (Tableau 10).

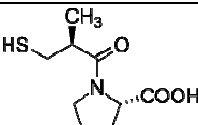
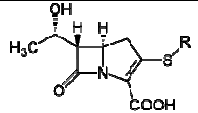
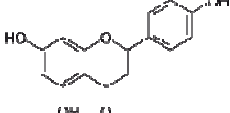
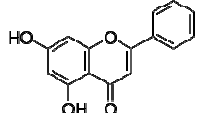
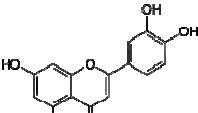
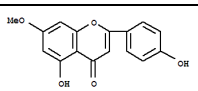
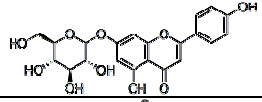
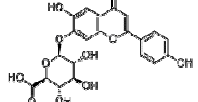
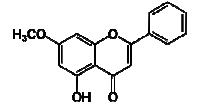
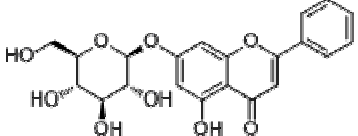
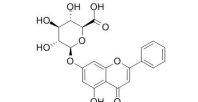
Complexe 4exs-ligand	Structure	ΔG_{bind} (kcal/mol)
Captoprile		-7.37
Carbapénème		-7.27
Apigénine		-8.95
Chrysrine		-9.06
Lutéoline		-8.69
Apigénine-7-OCH3		-9.06
Apigénine-7-glucoside		-10.16
Apigénine-7-glucuronide		-9.47
Chrysrine-7-O-CH3 Techtochrysrine		-9.29
Chrysrine-7-glucoside Equinoctine		-10.18
Chrysrine-7-glucuronide		-9.57

Tableau 10 : Valeurs de ΔG_{bind} des complexes 4exs/flavones

IV.4.2. Étude des complexes Flavones/4ex

❖ *Complexe Cap /4exs*

Lors du docking, le captopril établit avec la 4exs trois liaisons hydrogènes par le biais de trois acides aminés appartenant au site actif : une avec Asn²²⁰, une deuxième avec His²⁸⁰ et une troisième avec Lys²¹¹ (**Tableau 11**).

Atome du ligand	Résidus	Distance (Å)
-O	Asn ²²⁰	2.75
-O	His ²⁸⁰	2.99
-O	Lys ²¹¹	2.97

Tableau 11 : Liaisons hydrogène dans le complexe captopril/4exs

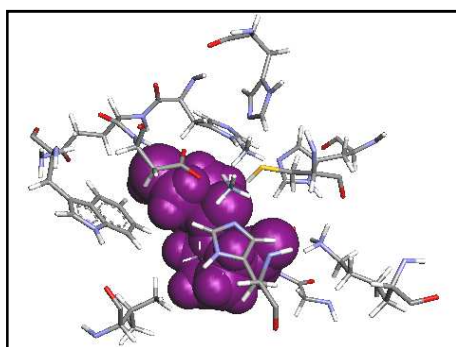


Figure 13 : Le captopril dans le site actif de la bêta-lactamase

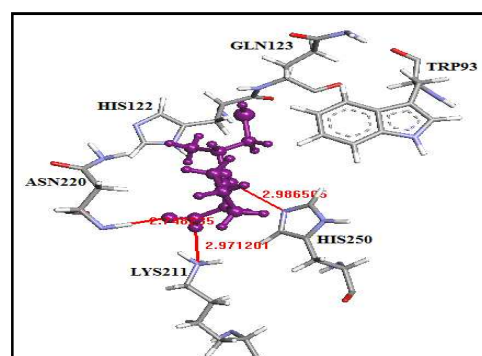


Figure14: Le captopril avec quelques résidus de la bêta-lactamase

❖ *Complexe Car /4exs*

Le carbapénème a établi avec l'enzyme deux liaisons hydrogènes, dont une avec Asp¹²⁴ et une autre avec His²⁸⁰ (**Tableau 12**)

Atome du ligand	Résidus	Distance (Å)
-O	Asp ¹²⁴	2.90
-O	His ²⁸⁰	2.46

Tableau 12 : Liaisons hydrogène dans le complexe carbapénème/4exs

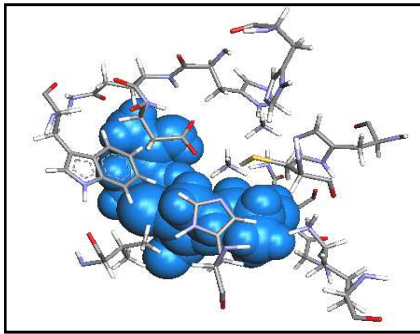


Figure 15 : La carbapénème dans le site actif de la bêtalactamase

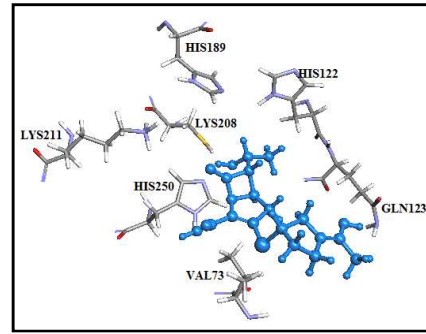


Figure 16: La carbapénème avec quelques résidus de la bêtalactamase

❖ **Complexe Api /4exs**

L'apigénine effectue trois liaisons hydrogène avec 4exs en position 7, 5 et 4' avec trois acides aminés consécutifs His²⁵⁰, Asp¹²⁴ et Gly⁷¹(Tableau 13).

Atome du ligand	Résidus	Distance (Å)
7-OH	His ²⁵⁰	2.90
5-OH	Asp ¹²⁴	2.89
4'-O	Gly ⁷¹	2.38

Tableau 13: Liaisons hydrogènes dans le complexe apigénine/4exs

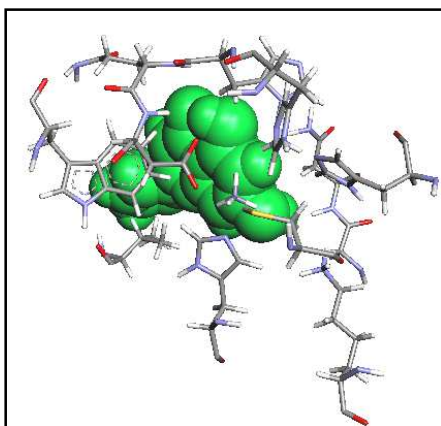


Figure 17 : L'apigénine dans le site actif de la bêtalactamase

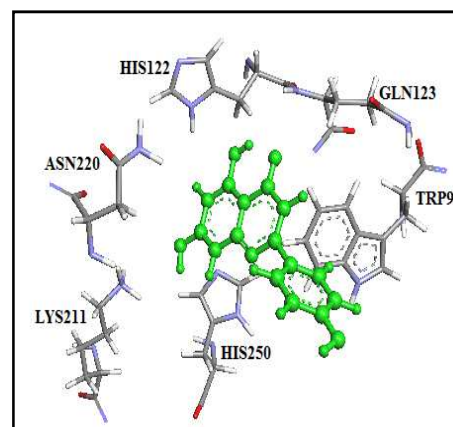


Figure 18: L'apigénine avec quelques résidus de la bêtalactamase

La chryisine établis trois liaisons hydrogènes avec deux acides aminés différents, une avec Asn²²⁰ et deux autres avec His¹⁸⁹ et His¹²² (Tableau 14).

Atome du ligand	Résidus	Distance (Å)
5-OH	Asn ²²⁰	2.99
7-OH	His ¹⁸⁹	2.85
7-OH	His ¹²²	2.68

Tableau 14: Liaisons hydrogène dans le complexe chryisine/4exs

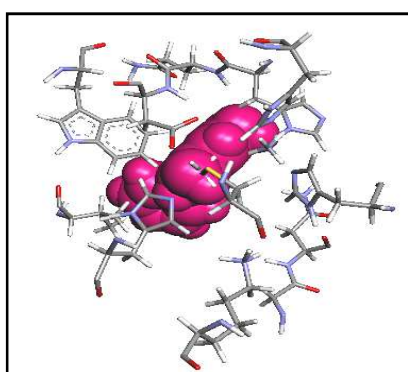


Figure 19 : La chryisine dans le site actif de la bêtalactamase

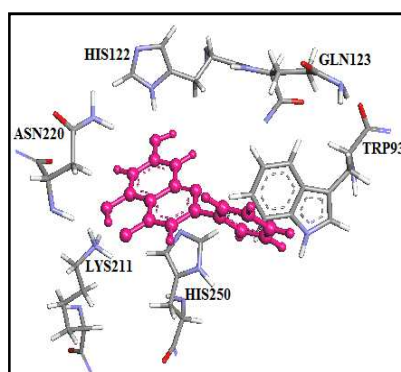


Figure 20: La chryisine avec quelques résidus de la bêtalactamase

❖ *Complexe Lut/4exs*

La lutéoline a établi avec l'enzyme deux liaisons hydrogènes, dont une avec Gly⁷¹ et une autre avec Asp¹²² (Tableau 15).

Atome du ligand	Résidus	Distance (Å)
7-OH	Gly ⁷¹	2.95
4'-OH	Asp ¹²²	2.98

Tableau 15: Liaisons hydrogène dans le complexe lutéoline/4exs

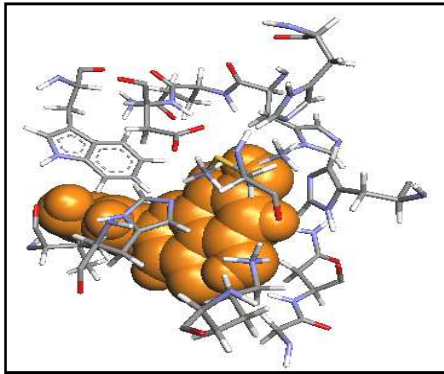


Figure 21: La lutéoline dans le site actif de la bêta-lactamase

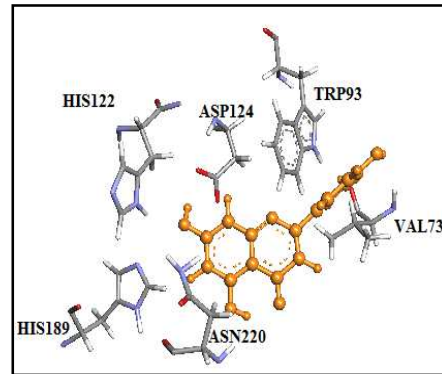


Figure 22: La lutéoline avec quelques résidus de la bêta-lactamase

❖ **Complexe Api -7-OCH3 /4exs**

L'apigénine-7-OCH3 effectue trois liaisons hydrogène avec trois acides aminés différents : Gly⁷¹, Asp¹²⁴, His²⁵⁰ (Tableau 16).

Atome du ligand	Résidus	Distance (Å)
4'-OH	Gly ⁷¹	2.33
5-OH	Asp ¹²⁴	2.75
7-OCH3	His ²⁵⁰	2.31

Tableau 16 : Liaisons hydrogène dans le complexe apigénine-7-OCH3/4exs

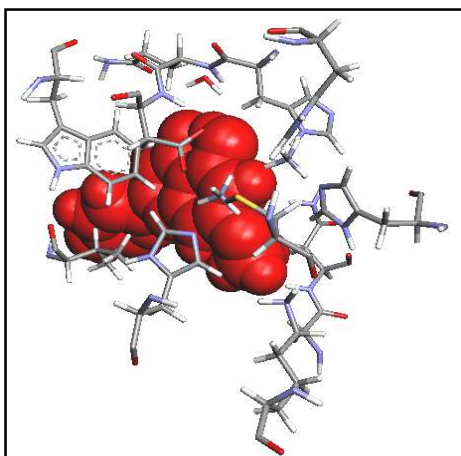


Figure 23: L'apigénine 7-OCH3 dans le site actif de la bêta-lactamase

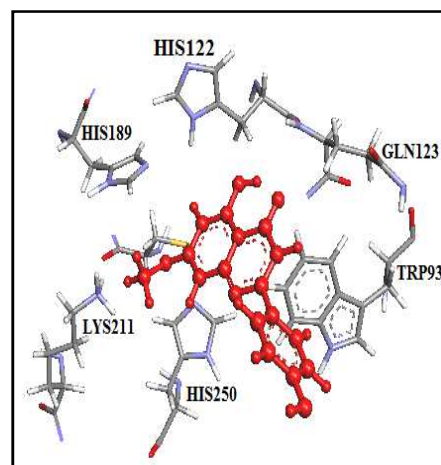


Figure 24 : L'apigénine 7-OCH3 avec quelques résidus de la bêta-lactamase

❖ *Complexe Api-7-glc/4exs*

L'apigénine-7-glucuronide établie avec 4exs cinq liaisons hydrogène avec deux acides aminées : le OH en 4'' se lie avec l'acides aminé Leu⁶⁵, alors que le OH de l'acide glucuronide en position 3'' se lie avec deux acides aminés différents Leu²¹⁸ et Lys²¹¹, ce dernier forme une liaison avec le OH de l'acide en 2'' (Tableau 17).

Atome du ligand	Résidus	Distances(Å)
4''-OH	Leu ⁶⁵	2.90
4''-OH	Leu ⁶⁵	2.81
2''-OH	Lys ²¹¹	2.96
3''-OH	Lys ²¹¹	2.39
3''-OH	Leu ²¹⁸	2.90

Tableau 17 : Liaisons hydrogène dans le complexe apigénine-7-glucuronide/4exs

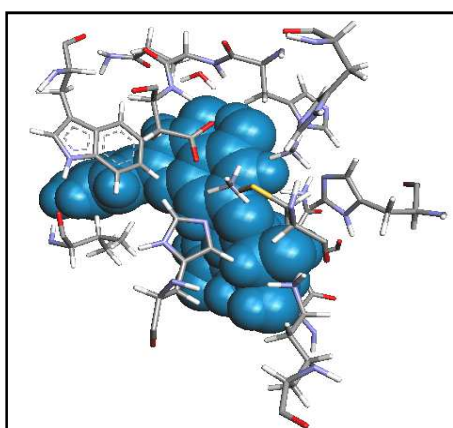


Figure 25: L'apigénine-7-gluc dans le site actif de la bêtalactamase

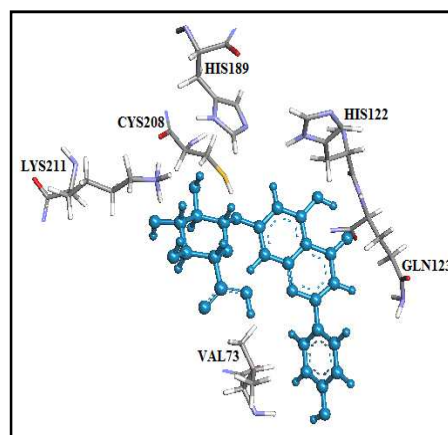


Figure 26: L'apigénine-7-gluc avec quelques résidus de la bêtalactamase

❖ *Complexe Api-7-glc /4exs*

L'Apigénine-7-glucoside établit avec 4exs des liaisons hydrogène avec quatre acides aminés différents. L'hydroxyle du sucre en 2'' et en 3'' se lie avec Lys²¹¹, alors que ceux en position 4'' du glucose le fait avec Leu⁶⁵ et Gly⁷¹, le OH du glucose en 2'' se lie au Lys²¹¹ et enfin une dernière liaison avec His²⁵⁰ (Tableau 18).

Atome du ligand	Résidus	Distance(Å)
4'-OH	Leu ⁶⁵	2.93
4'-OH	Gly ⁷¹	2.75
-O-7	His ²⁵⁰	2.99
2''-OH	Lys ²¹¹	2.66
3''-OH	Lys ²¹¹	2.80
3''-OH	Leu ²¹⁸	2.82

Tableau 18 : Liaisons hydrogène dans le complexe apigénine-7-glucoside/4exs

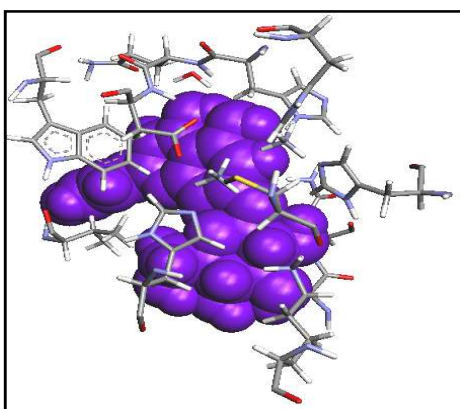


Figure 27: L'apigénine-7-glc dans le site actif de la bêtalactamase

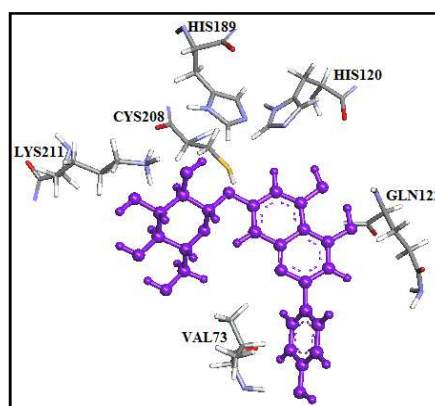


Figure 28: L'apigénine-7-glc avec quelques résidus de la bêtalactamase

❖ *Complexe chr-7-OCH₃/4exs*

La chrysine-7-OCH₃a établi une seul liaison hydrogène avec l'acide aminé His²⁵⁰(Tableau 19).

Atome du ligand	Résidus	Distance(Å)
7-OCH3	His ²⁵⁰	2.45

Tableau 19 : Liaisons hydrogène dans le complexe chrysine-7-OCH₃/4exs

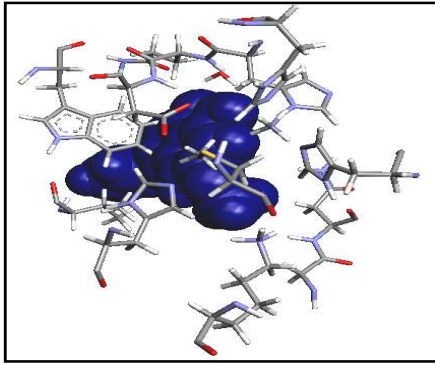


Figure 29 : La chrysin-7-OCH3 dans le site actif de la bêta-lactamase

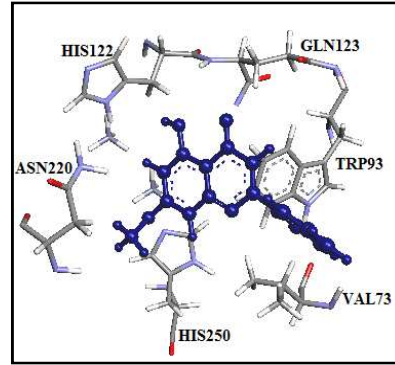


Figure 30 : La chrysin-7-OCH3 avec quelques résidus de la bêta-lactamase

❖ *Complexe Chr-7- gluc/4exs*

La chrysin-7-glucuronide établit des liaisons hydrogène avec trois acides aminés différents His²⁵⁰, Asn²²⁰, Lys²¹¹ (Tableau 20).

Atome du ligand	Résidus	Distance(Å)
7-OH	His ²⁵⁰	2.80
-OH	Asn ²²⁰	2.90
-O	Lys ²¹¹	2.79

Tableau 20 : Liaisons hydrogène dans le complexe chrysin-7-glucuronide/4exs

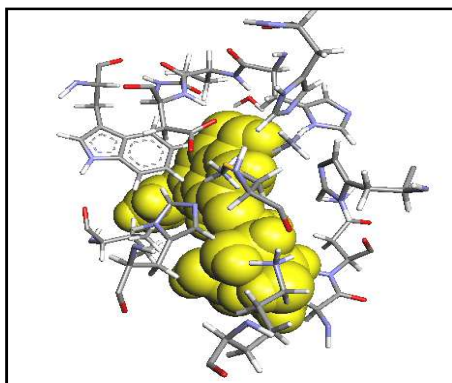


Figure 31: La chrysin-7-gluc dans le site actif de la bêta-lactamase

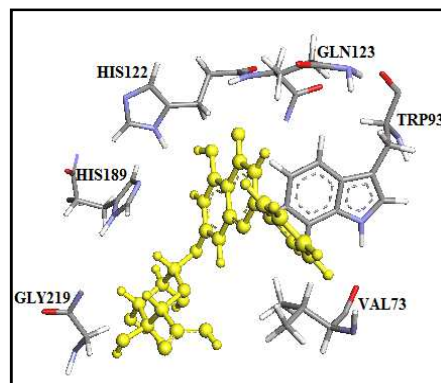


Figure 32: La chrysin-7-gluc avec quelques résidus de la bêta-lactamase

❖ Complexe chr-7-O-glc/4exs

La chrysine-7-O-glucoside effectue quatre liaisons hydrogène avec enzyme par le biais de trois acides aminés : His²⁵⁰, Lys²¹¹, Leu²¹⁸ (Tableau 21).

Atome du ligand	Résidus	Distance(Å)
O-7	His ²⁵⁰	2.59
2''-OH	Lys ²¹¹	2.03
3''-OH	Lys ²¹¹	2.14
3''-OH	Leu ²¹⁸	2.69

Tableau 21: Liaisons hydrogène dans le complexe chrysine-7-O-glc/4exs

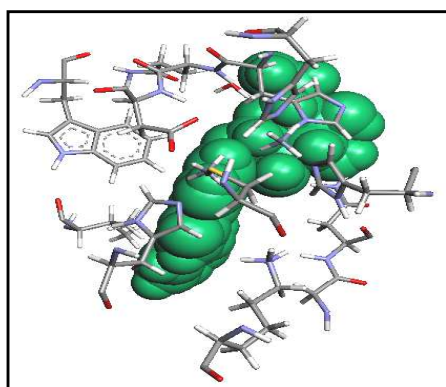


Figure 33: La chrysine-7-glc dans le site actif de la bêtalactamase

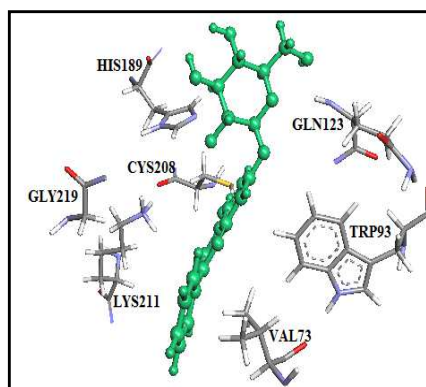


Figure 34: La chrysine-7-glc avec quelques résidus de la bêtalactamase

IV.5. Conclusion :

En analysant les différentes interactions obtenues grâce à la simulation du docking moléculaire effectué avec le logiciel gratuit ArgusLab 4.01 et en comparant les énergies des complexes, nous remarquons que ceux formés avec les aglycones et les hétérosides choisis présentent des valeurs inférieures à celles de la molécule référence captopril et du carbapénème.

Les trois aglycones : lutéoline, apigénine et chrysine exhibent des valeurs de ΔG_{bind} décroissantes. En effet, la chrysine avec son ΔG_{bind} de -9,06 kcal/mol aurait une meilleure affinité envers

l'enzyme NDM1. Elle sera suivie par l'apigénine, la lutéoline se classant en troisième position.

Chrysine	Apigénine	Lutéoline
-9,06kcal/mol	-8,95 kcal/mol	-8,69 kcal/mol

Ces résultats *in silico* vont dans le même sens que ceux trouvés *in vitro* par l'équipe de **Liu(2010)** qui suggère que les relations entre la structure de ces flavonoïdes et leur activité semblent indiquer que les aglycones avec polarité relativement faible ont un pouvoir antimicrobien plus fort. Effectivement, en comparant les 3 molécules, on peut supposer que l'augmentation des hydroxyles sur le noyau B n'est pas favorable à l'activité antimicrobienne pour les dérivés de flavones, en conséquence de quoi la chrysine qui ne possède aucun substituant est classée en premier, vient ensuite l'apigénine avec un seul OH en 4'. La lutéoline prend le troisième rang avec ses di-OH en position 3'et 4'.

Pour le second volet de ce travail, la comparaison se fait entre les dérivés de la chrysine et de l'apigénine, chacun dans sa série. Nous remarquons alors, que les dérivés glucosylés (chrysine-7-glc et apigénine-7-glc) se placent en premier, suivis des dérivés glucuronides (chrysine-7-gluc et apigénine-7-gluc) vient ensuite la chrysine-7-OCH₃ et l'apigénine-7-OCH₃.

Chrysine	-9,06kcal/mol	Apigénine	-8,95 kcal/mol
Chrysine-7-glucoside (Equinoctine)	-10.18 kcal/mol	Apigénine-7-glucoside	-10.16 kcal/mol
Chrysine-7-glucuronide	-9.57 kcal/mol	Apigénine-7-glucuronide	-9.47 kcal/mol
Chrysine-7-O-CH ₃ (Techtochrysine)	-9.29 kcal/mol	Apigénine-7-OCH ₃	-9.06 kcal/mol

Après ce constat, nous déduisons que la substitution du OH en position 7 du cycle A diminue l'énergie de formation du complexe (ligand-récepteur) ce qui augmente l'affinité du ligand envers la 4^{exs} et que la nature du radical influe également sur le ΔG_{bind} .

Conclusion générale

Le présent mémoire représente une contribution qui rentre dans le cadre de la recherche d'inhibiteurs antimicrobiens, de préférence issus du métabolisme secondaire des plantes, pour se substituer aux antibiotiques. Pour réaliser ce travail deux études ont été réalisées, l'une *in vitro* et l'autre *in silico*.

L'étude *in vitro*, effectuée au niveau des laboratoires de bactériologie du **CHU Ben Badis** et de **l'hôpital El Bir**, consiste à tester l'efficacité des extraits méthanoliques de trois plantes (*Origanum vulgare*, *Eucalyptus globulus* et *Rosmarinus officinalis*) comme agents antimicrobiens vis-à-vis de *Klebsiella pneumoniae* par la méthode de diffusion sur gélose par les puits.

Les résultats obtenus indiquent que *Kp* présente une certaine sensibilité envers les trois extraits méthanoliques avec une préférence pour l'*Origanum vulgare* (20 mm).

L'étude *in silico* des interactions entre la NDM-1 et les flavones a été accomplie au niveau du laboratoire **LCMC** grâce à des techniques de modélisation via la simulation, notamment le docking moléculaire. La molécule captopril, tirée de la structure cristallographique 3D du complexe 4exs, sert de référence.

L'outil informatique utilisé pour le docking est le logiciel gratuit ArgusLab 4.01. Les énergies de liaison ΔG_{bind} ainsi que les liaisons hydrogène formées dans les complexes protéine-ligands sont employées pour analyser les interactions entre les différentes flavones testées et le site actif de la NDM-1. Les informations recueillies, après criblage, permettent de déterminer quels sont les complexes les plus stables.

Confrontées entre elles et comparées à la molécule référence le captopril (-7,37 kcal/mol), les trois aglycones chryisine, apigénine et lutéoline se classent comme suit :

- 1- Chryisine (-9, 06 kcal/mole)
- 2- Apigénine (-8,95 kcal/mole)
- 3- Lutéoline (-8, 69 kcal/mol)

Ces résultats obtenus *in silico* sont confirmés par l'étude réalisée *in vitro* établit par **Liu** et ses collaborateurs en **2010**.

En comparant les deux séries de dérivés de flavones, nous constatons que ceux qui sont glucosylés en 7 (chryisine-7-glc (-10,18 kcal/mole) et apigénine-7-glc (-10,16 kcal/mole)) se

positionnent chacun dans sa classe en tête de liste suivis de ceux dont le OH en 7 est substitué par l'acide glucuronide (chryisine-7-gluc (-9,57 kcal/mol), apigénine-7-gluc (-9,47 kcal/mol)). La chryisine-7-OCH₃ (-9,29 kcal/mole) et l'apigénine-7-OCH₃ (-9,06 kcal/mole) terminent en dernière place.

Toujours du point de vue énergétique, parmi les neuf molécules évaluées et comparativement aux deux antibiotiques captopril (-7,37 kcal/mol) et carbapénème (-7,27 kcal/mol), la chryisine-7-glc (-10,18 kcal/mol) forme le complexe le plus stable et par conséquent se retrouve en tête de liste.

L'étude *in vitro* vient confirmer les résultats obtenus *in silico* qui vise à prédire que, la chryisine, l'apigénine et la lutéoline peuvent jouer le rôle d'inhibiteurs potentiels de la NDM-1.

Par ce travail là, nous pouvons conclure que les extraits méthanoliques des plantes pourraient représenter une alternative aux antibiotiques et pour authentifier ces propos il faudra sans doute réaliser des études *in vitro* et surtout *in vivo*.

Références bibliographiques

Akifumi ODA, Ohgi Takahashi, 2009-Validation of ArgusLab Efficiencies for Binding Free Energy Calculations. Chem-Bio Informatics Journal, 9: 52-61.

Alexopoulos A, Kimbaris AC, Plessas S, Matzourani I, Theodoridou I, Stavropoulou E, Polissiou MG, Bezirtzoglou E, 2011-Antimicrobial activities of essential oil from eight Greek aromatic plants against clinical isolates of *Staphylococcus aureus* Anaerobe, 17: 399-402.

Arima H, Ashida H, Danno G, 2002-Rutin-enhanced Antibacterial Activities of Flavonoids against *Bacillus cereus* and *Salmonella enteritidis*. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 66 (5): 1009-1014.

Bastard K, 2005-Assemblage flexible de macromolécules : la théorie du champ moyen appliquée au remodelage des boucles protéiques. UFR Biologie et Sciences de la Nature.

Bi D et al, 2012-ICEberg: a web-based resource for integrative and conjugative elements found in Bacteria. Nucleic Acids Res.40:621-626.

BergheVA and Vlietinck AJ, 1991-Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants, Methods for Plant Biochemistry, 6: 47-68.

Chuang YP, Fang CT, Lai SY, Chang SC, and Wang JT, 2006 - Genetic determinants of capsular serotype K1 of *Klebsiella pneumoniae* causing primary pyogenic liver abscess. J. Infect. Dis. 193:645-654.

Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM, 2011- Metallo- β -lactamases: a last frontier for β -lactams .Lancet Infectious Diseases, 11: 381-393.

Cristobal NA, Mario C, Raul R, Gutierrez-Sanchez, Ascencion RC, Augur C, 2004-Catechin degradation by several fungal strains isolated from Mexican desert. Journal of Microbiology and Biotechnology, 14(2): 426.

Cushnie TP, Lamb AJ, 2011-Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. Int. J Antimicrob Agents, 38: 99-107.

Doi Y, O'Hara JA, Lando JF, Querry AM, Townsend BM, Pasculle AW, Muto CA, 2014-Co-production of NDM-1 and OXA-232 by *Klebsiella pneumoniae*. Emerg Infect Dis. 20:163-165.

Du F, Zhang F, Chen F et al, 2011-Advances in microbial heterologous production of flavonoids, African Journal of Microbiology Research, 18(5): 2566-2574.

Elhissi A, Brar J, Najlah M, Roberts S, Faheem A and Taylor K M G, 2013-An ethanol-based liposomes technology for enhanced delivery and improved "respirability" of antiasthma aerosols generated using a micropump vibrating-mesh nebulizer. J. Pharm. Technol. Res. Manage, 1: 171-180.

- Erlund Iris, 2004. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research*,24(10): 851-874.
- Fang CT, Chuang YP, Shun CT, Chang SC, and Wang JT, 2004-A novel virulence gene in *Klebsiella pneumoniae* strains causing primary liver abscess and septic metastatic complications. *J. Exp. Med.* 199: 697-705.
- Freney J, Hansen W, et Bollet TC, 2000-Précis de bactériologie clinique. Editions ESKA, Paris, 1692 pp.
- Friedman M, 2007-Overview of antibacterial, antitoxin, antiviral, and antifungal activities of tea flavonoids and teas.*MolNutr Food Res.*51: 116-34.
- Fukai T, Marumo A, Kaitou K, Kanda T, Terada S. & Nomura T, 2002-Antimicrobial activity of licorice flavonoids against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Fitoterapia*, 73: 536-539.
- Gao F, Zhang CT, 2008-Ori-Finder: a web-based system for finding oriCs in unannotated bacterial genomes, *BMC Bioinformatics*, 9:79.
- Gengmao Z, Yu H, Xing S, Shihui L, Quanmei S, Changhai W, 2015-Salinity stress increases secondary metabolites and enzyme activity in safflower. *Industrial Crops and Products*, 64:175-181.
- George M Garrity, Julia A Bell et Timothy G Lilburn, 2004-Taxonomic Outline of the Procaryotes. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Second Edition, 10:1007.
- Gomez-Caravaca AM, Gomez-Romero M, Arraez-Roman D, Segura-Carretero AH, Fernandez-Gutierrez A, 2006-Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41: 1220-1234.
- Heiat M, Rezaeimehr MR, MoghaddamMM, Ranjbar R etNajafi A, 2014-Molecular Genetics, *Microbiology and Virology*, 4(29): 211-215.
- Hamdan Z et al, 2011-Epidemiology of urinary tract infections and antibiotics sensitivity among pregnant women atKhartoum north hospital, 10:1186-1476.
- Haraguchi H, Tanimoto K, Tamura Y, Mizutani Kand Kinoshita T, 1998- Mode of antibacterial action of retrochalcones from *Glycyrrhizainflata*, *Phytochemistry*, 1(48): 125-129.
- Hennequin C, Forestier C, 2007-Influence of capsule and extended-spectrum beta-lactamases encodes plasmids upon *Klebsiellapneumoniae* adhesion. *Research in Microbiology*, 158: 339-347.
- Hennequin C, Robin F, Cabrolie N, Bonnet R, et Forestiera C, 2012-Characterization of a DHA-1-Producing *Klebsiellapneumoniae*Strain Involved in an Outbreak and Role of the AmpR Regulator in Virulence. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 288–294.
- Hernández I, Alegre L, Van Breusegem F, Munné- Bosch S, 2009-How relevant are flavonoids as antioxidants in plants *Trends Plant Sci*,14: 125-32.

Jean Dubois, Henri Mitterand, Albert Dauzat, 2006-Dictionnaire étymologique et historique du français, Éditions Larousse, Paris.

Jiang Y, et al, 2010-Complete nucleotide sequence of *Klebsiellapneumoniae* Multidrug resistance plasmid pKP048, carrying *blaKPC-2*, *blaDHA-1*, *qnrB4*, and *armA*. Antimicrob. Agents Chemother, 54: 3967-3969.

Joly B et Reynaud A, 2002-Entérobactéries. Systématique et méthodes de diagnostic,79: 80-83.

Kariuki S, Corkill JE, Revathi G, Musoke R, Hart A, Keynan Y, Rubinstein E,2007-The changing face of *Klebsiellapneumoniae*infections in the community. International journal of Antimicrobiol Agents 6: 2474-2479.

Kohanski MA, Dwyer DJ and Collins JJ, 2010-How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. Nat. Rev. Microbiol.8: 423-435.

Krziesinski JM, Scheen AJ,2004-Le médicament du mois : OlmésartanMédoxomil (Belsarou Olmetec), *Rev Med Liege*,10(59) : 607-611.

Lai HJ, Cheng Y, Cho H, Kosorok MR and Farrell PM, 2004-Association between initial disease presentation, lung disease outcomes, and survival in patients with cystic fibrosis. Am. J. Epidemiol. 159: 537-546.

Le Minor L et Véron M, 1989-Bactériologie médicale, 2éme édition, Flammarion Médecine-Sciences, Paris, 2: 428-432.

Leach AR, 2001-Molecular modelling, Principles and Application, Prenticehall, New jersey.

Lee JY, Jeong KW, Shin S, Lee, JU, and Kim Y, 2009-Bioorg.Med.Chem.17: 5408-5413.

Leite de Souza E, de Barros JC, de Oliveira CE, da Conseiceao M, 2011-Influence of *Origanumvulgare* L. essential oil on enterotoxin production, membrane permeability and surface characteristics of *Staphylococcus aureus* International Journal of Food Microbiology, 137: 308-311.

Liu Hao, Yan Mou, Jianglin Zhao, Jihua Wang, Ligang Zhou,Mingan Wang,Daoquan Wang, Jianguo Han, Zhu Yu and Fuyu Yang,2010-Flavonoids from *Halostachyscaspica*and Their Antimicrobial and Antioxidant Activities, 15: 7933-7945.

Liotta D,1988-Advances in Molecular Modeling, Ed. JAI Press. p1.

López-Lázaro M, 2009-Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin,Mini.Rev.Med. Chem. 1(9): 31–59.

Lu MF, Xiao ZT, Zhang HY, 2013-Where do health benefits of flavonoids come from? Insights from flavonoids targets and their evolutionary history.BiochemBiophys Res. Commun, 4:434-701.

Maréchal Y, 2007-The hydrogen bond and the water molecule Elsevier Science & Technology, 11: 589-603.

MelpomeneSkoula, René J Grayer, Geoffrey C Kite, Nigel C Veitch, 2008-Biochemical Systematics and Ecology, 36: 646-654.

Mishra A, Sharma AK, Kumar S, Saxena AK and Pandey AK, 2013- Bauhinia variegata leaf extracts exhibit considerable antibacterial, antioxidant and anticancer activities, BioMedResearch International, Article ID 915436, 10 pp.

Neto C, 2007-Cranberry and blueberry: evidence for protective effects against cancer and vascular diseases. Mol. Nutr. Food Res. 51: 652-64.

Nordmann P, Cuzon G, Naas T, 2009-The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase - producing bacteria. Lancet Infect. 9: 228-236.

Pandey R, Sharma S and Khuller GK, 2004-Nebulization of liposome encapsulated antitubercular drugs in guinea pigs. Int. J. Antimicrob. Agents, 24: 93-94.

Paterson DL, Bonomo RA, 2005- Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. Clin Microbiol Rev. 18: 65-78.

Paul Roy, 1997-Dissémination de la résistance aux antibiotiques : le génie génétique à l'œuvre chez les bactéries. Médecine / sciences, 13: 8-9.

Pistelli L, Giorgi I: Antimicrobial Properties of Flavonoids. In Patra AK, 2013- ed Dietary Phytochemicals and Microbes. Springer: Netherlands, 33-91.

Podschun R and Ullmann U, 1998-*Klebsiella spp.* as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. Clin. Microbiol. Rev. 11: 89-603.

Ramakrishna A and Ravishankar G A, 2011-Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. Plant Signaling & Behavior, 6(11): 1-12.

Ramos FA, Takaishi Y, Shirotori M, Kawaguchi Y, Tsuchiya K, Shibata H, Higuti T, Tadokoro T and Takeuchi M, 2006-J. Agric. Food Chem. 54: 3551-3557.

Rukholm G, Mugabe C, Azghani AO and Omri A, 2006-Antibacterial activity of liposomal gentamicin against *Pseudomonas aeruginosa*: a time-kill study. Int. J. Antimicrob. Agents, 27: 247-252.

Sankaranarayanan S, Bama P, Ramachandran J et al, Ethnobotanical study of medicinal plants used by traditional users in Villupuram district of Tamil Nadu, India, Journal of Medicinal Plant Research, 12(4): 1089-1101.

Sharma DK, 2006-Bioprospecting for drug, research and functional foods for the prevention of diseases- Role of flavonoids in drug development. J Sci Ind Res. 65: 391-401.

Silver L, 2006-Does the cell wall of bacteria remain a viable source of targets for novel antibiotics? Biochem. Pharmacol. 71: 996-1005.

Srinivasan VB, Vaidyanathan V, Mondal A, Rajamohan G, 2012-Role of the Two Component Signal Transduction System CpxAR in Conferring Cefepime and Chloramphenicol Resistance in *Klebsiellapneumoniae* NTUH-K2044, 7 (4): 33-777.

Surh YJ, 2003-Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. Nat. Rev. Cancer, 3(10): 768-780.

Toulhoat H, 2007-Modélisation moléculaire : Bases théoriques des propriétés microscopiques aux propriétés macroscopiques. Techniques de l'ingénieur J. 1-013

Tumbarello M, Sanguinetti M, Montuori E, and al., 2007-Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by extended spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae: importance of inadequate initial antimicrobial treatment. Antimicrobial Agents Chemotherapy, 51:1987-1994.

Veluri R, Weir TL, Bais HP, Stermitz FR, Vivanco JM, 2004-Phytotoxic and antimicrobial activities of catechin derivatives. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52(5): 1077-1082.

Warren GL, Andrews CW, Capelli AM, and al., 2006-A Critical Assessment of Docking Programs and Scoring Functions, J. Med. Chem. 49: 5912-5931.

Yala D, Merad AS, Mohamedi D et Ouar Korich MN, 2001-Classification et mode d'action des antibiotiques. Médecine du Maghreb n°9.

Yang H, Chen Q, Yang M, Chen and Wang H, 2008-High prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance genes *qnr* and *aac-Ib-crin* clinical isolates of Enterobacteriaceae from nine teaching hospitals in China, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 12(52): 4268-4273.

Yeh KM, Kurup A, Siu LK, and al., 2007-Capsular serotype K1 or K2, rather than *magA* and *rmpA*, is a major virulence determinant for *Klebsiellapneumoniae* liver abscess in Singapore and Taiwan. J. Clin. Microbiol, 45: 466-471.

Zhang J, et al, 2011-Expansion of the known *Klebsiellapneumoniae* species gene pool by characterization of novel alien DNA islands integrated into tmRNA gene sites. J. Microbiol. Methods, 84:283-289.

Résumé

Le présent travail s'articule autour de la recherche d'éventuels inhibiteurs antimicrobiens issus du métabolisme secondaire des plantes (*Origanum vulgare*, *Eucalyptus globulus* et *Rosmarinus officinalis*). Cette étude visant à tester l'efficacité des extraits méthanoliques vis-à-vis de *Klebsiella pneumoniae* est réalisée sur deux niveaux, *in vitro* et *in silico*.

Les résultats obtenus *in vitro* grâce à la technique de diffusion par puits sur gélose démontrent que *Klebsiella pneumoniae* isolée des urines d'un patient présente une certaine sensibilité envers les trois extraits avec une préférence pour *Origanum vulgare*.

Employé pour réaliser l'étude *in silico*, le docking moléculaire vise à prédire la structure 3D d'un complexe formé à partir de petites molécules et d'une enzyme afin d'évaluer le mode de fixation et les différentes interactions établies entre les deux entités.

Dans ce contexte, ArgusLab 4.01, logiciel gratuit est utilisé pour estimer l'affinité de certains flavonoïdes vis-à-vis de la NDM-1 une enzyme responsable de la résistance aux antimicrobiens chez les Gram négatif.

L'étude *in vitro* vient pour confirmer les résultats obtenus *in silico* et qui vise à prédire que les composés phénoliques (chrysin, apigénine et lutéoline) présentant des capacités d'inhibition vis-à-vis de *Klebsiella pneumoniae* peuvent jouer le rôle éventuel d'antimicrobiens.

Mots clés: *Klebsiella pneumoniae*, résistance, flavonoïdes, docking, ArgusLab, *in silico*, *in vitro*

Summary

This work focuses on the search for potential antimicrobial inhibitors derived from secondary plant metabolism (*Origanum vulgare*, *Eucalyptus globulus* and *Rosmarinus officinalis*). This study to test the effectiveness of methanolic extracts against *Klebsiella pneumoniae* is carried out at two levels *in vitro* and *in silico*.

The results obtained *in vitro* using the technique of diffusion wells on agar showed that *Klebsiella pneumoniae* isolated from the urine of a patient has a certain sensitivity towards the three extracts with a preference for *Origanum vulgare*.

It is used for the analysis *in silico* molecular docking , which aims to predict the 3D structure of a complex formed from small molecule and an enzyme to evaluate the method of fixing different interactions established between two entities.

In this context, ArgusLab 4.01, free software is used to estimate the affinity of some Flavonoids against NDM -1 enzyme responsible for antimicrobial resistance in Gram-negative.

The *in silico* study is to confirm the results obtained *in vitro*, which aims to predict that phenolic compounds (chrysin, apigenin and luteolin) with capabilities against *Klebsiella pneumoniae* inhibition may play the role of potential antimicrobials.

Les extraits de plantes comme alternative à la résistance de *Klebsiella pneumoniae*: Etude *in vitro* et *in silico*

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Génétique Moléculaire.

Résumé

Le présent travail s'articule autour de la recherche d'éventuels inhibiteurs antimicrobiens issus du métabolisme secondaire des plantes (*Origanum vulgare*, *Eucalyptus globulus* et *Rosmarinus officinalis*). Cette étude visant à tester l'efficacité des extraits méthanoliques vis-à-vis de *Klebsiella pneumoniae* est réalisée sur deux niveaux, *in vitro* et *in silico*.

Les résultats obtenus *in vitro* grâce à la technique de diffusion par puits sur gélose démontrent que *Klebsiella pneumoniae* isolée des urines d'un patient présente une certaine sensibilité envers les trois extraits avec une préférence pour *Origanum vulgare*.

Employé pour réaliser l'étude *in silico*, le docking moléculaire vise à prédire la structure 3D d'un complexe formé à partir de petites molécules et d'une enzyme afin d'évaluer le mode de fixation et les différentes interactions établies entre les deux entités.

Dans ce contexte, ArgusLab 4.01, logiciel gratuit est utilisé pour estimer l'affinité de certains flavonoïdes vis-à-vis de la NDM-1 une enzyme responsable de la résistance aux antimicrobiens chez les Gram négatif.

L'étude *in silico* vient pour confirmer les résultats obtenus *in vitro* et qui vise à prédire que les composés phénoliques (chryssine, apigénine et lutéoline) présentant des capacités d'inhibition vis-à-vis de *Klebsiella pneumoniae* peuvent jouer le rôle éventuel d'antimicrobiens.

Mots clés : *Klebsiella pneumoniae*, résistance, flavonoïdes, docking , ArgusLab, *in vitro*, *in silico*

Laboratoire de recherche : Laboratoire de Chimie des Matériaux Constantine (LCMC)

Jury d'évaluation :

Présidente: Mme SATTI D. (PR. - UFM Constantine)

Examineur : M. KRID A. (MAA - UFM Constantine)

Examinatrice : Mme REZGOUNE D. (MCA - UFM Constantine)

Rapporteuse : Mme BENCHERAIET R. (MCA - UFM Constantine)

Date de soutenance : 28/06/2016