

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE  
LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
جامعة باجي مختار - عنابة  
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA



Département de Biochimie  
Laboratoire de Biochimie et Microbiologie Appliquées



**THESE**

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Microbiologie  
Option : Microbiologie Appliquée

**THEME**

**Evaluation de l'activité antimicrobienne et de l'effet génotoxique,  
*in vitro*, de molécules chimiques néosynthétisées**

Présentée par : M<sup>elle</sup> BECHEKER Imène

Devant le jury :

Directrice de thèse :	MCA. BERREDJEM Hajira	Université d'Annaba
Présidente :	Pr. GACEMI-KIRANE Djamila	Université d'Annaba
Examineur :	Pr. BENOURETH Djamel Eddine	Université de Guelma
Examinatrice :	Pr. CHETTIBI Houria	Université d'Annaba
Examinatrice :	MCA. ABDI Akila	Université d'Annaba

Année universitaire : 2015-2016

## **Remerciements**

*Tout d'abord, Je remercie dieu le tout puissant de m'avoir donné le courage, la patience et la force de vouloir et pouvoir continuer surtout dans les moments de doutes, de m'avoir ouvert toute les portes me permettant de mener à terme mon travail.*

*Toute ma gratitude s'adresse à ma directrice de thèse le Docteur Berredjem Hajira, Maitre de Conférences classe A, Université Badji Mokhtar-Annaba. Je vous remercie d'avoir toujours cru en moi, de m'avoir soutenue, encouragé, conseillé et surtout de la confiance que vous m'avez accordé, me permettant ainsi, d'acquérir une certaine rigueur et d'approfondir mes connaissances. Grâce à votre disponibilité ainsi qu'à votre partage de connaissances inconditionnel vous m'avez donné l'occasion de m'initier à la recherche, à l'enseignement et à l'encadrement. Je vous remercie pour votre gentillesse, pour tous les moments qu'on a pu passer ensemble. Je vous remercie pour tout.*

*Je tiens à remercier Madame Gacemi-Kirane Djamilia, Professeur à l'université Badji Mokhtar-Annaba, Responsable de la Formation Doctorale, pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury de ma soutenance de thèse. Je vous exprime par ces mots mes sincères considérations.*

*Je remercie Monsieur Benouareth Djamel Eddine, Professeur à l'Université de Guelma, pour m'avoir fait l'honneur de faire partie de mon jury de thèse, d'examiner ce travail et surtout d'avoir fait le déplacement.*

*Je remercie Madame Chettibi Houria, Professeur à l'université Badji Mokhtar-Annaba, pour m'avoir fait l'honneur de faire partie de mon jury de thèse et d'avoir eu la gentillesse d'examiner mon travail.*

*Je tiens à exprimer ma gratitude à Madame Abdi Akila, Maitre de Conférences classe A, Université Badji Mokhtar-Annaba, pour m'avoir fait l'honneur de faire partie de mon jury de thèse et d'examiner mon travail. Je vous remercie pour toutes les fois où vous n'avez pas hésité à m'encourager. Vous êtes un exemple pour moi.*

*Je remercie Monsieur Ladjama Ali, Professeur à l'université Badji Mokhtar-Annaba, et directeur de laboratoire de Biochimie et Microbiologie Appliquées, UMBA, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, d'avoir réuni toutes les conditions propices au bon déroulement de nos travaux de recherche. Je vous remercie infiniment pour votre aide et votre gentillesse.*

*Je remercie Docteur Bensalah, Docteur Chellali et Docteur Mizi pour m'avoir accueilli au niveau de leurs laboratoires d'analyses médicales ainsi que pour leur collaboration en me permettant d'avoir les souches bactériennes nécessaires à mon travail de recherche. Je remercie également tout le personnel de ces laboratoires.*

*Je remercie le Professeur Dekhil Mazouz (Laboratoire de Microbiologie, CHU Dorban-Annaba) pour m'avoir permis de faire ma collecte de souches.*

*Je remercie Madame Berredjem Malika, Professeur à l'université Badji Mokhtar-Annaba, (Laboratoire de Chimie Organique Appliquée), pour sa collaboration, sa confiance et ses encouragements.*

*Je remercie Monsieur Djeribi Riadh, Professeur à l'université Badji Mokhtar-Annaba pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, et d'avoir mis à ma disposition le lecteur de microplaques.*

*Je remercie Monsieur Kara M. Hichem, Professeur à l'université Badji Mokhtar-Annaba, (Laboratoire des bioressources marines, UBMA), pour sa précieuse aide, en me permettant l'acquisition du matériel biologique nécessaire pour la réalisation du test de cytotoxicité.*

*Mes chers parents, Je sais qu'un simple merci ne suffit pas pour vous exprimer toute ma gratitude, et mon amour. Je vous remercie pour le soutien inconditionnel, moral et financier, je vous remercie d'être toujours là pour moi. Que dieu vous garde.*

*Un grand merci à ma sœur « Manel » et à mon frère « Ali ». Merci pour votre complicité, merci pour votre soutien et vos encouragements inconditionnels. Vous êtes le soleil de ma vie.*

*A mes collègues, amies et sœurs : Zineb, Aicha, Zahra, Samia, Badra; merci pour tous les bons moments qu'on a passé ensemble au sein du laboratoire 36. Merci pour la bonne ambiance qui nous a permis d'avancer malgré les obstacles.*

*Je remercie le personnel du Département de Biochimie et spécialement nos techniciennes et techniciens de laboratoires, à commencer par Madame Adra, Monsieur Lazhar et Madame Saida, merci pour l'aide précieuse que vous m'avez apporté. Je remercie également Madame Sakina, Mouna, Nadjoua et Bochra.*

*A mon amie d'enfance Aicha Smach, enseignante d'anglais à l'université Badji Mokhtar-Annaba, je te remercie pour ton aide précieuse pour la correction de mon article, et surtout d'avoir toujours été une bonne amie.*

*Je tiens à exprimer mes profonds remerciements à l'ensemble de mes amis(es), qui sauront se connaître. Je vous remercie d'avoir enrichi ma vie, je vous remercie pour tout ce que vous m'apportez au quotidien.*

*Je remercie ma tante Souad pour son aide précieuse ainsi que ses encouragements.*

*Je remercie Monsieur Sbahi Azzedine pour les efforts qu'il a déployés en m'aidant ainsi à obtenir les réactifs nécessaires à la réalisation de mes travaux.*

*Merci à toutes les formidables personnes que j'ai pu connaître au cours des sept années de préparation de ma thèse : Souad, Wafa, Soumaya, Jihan, Sameh, Wided et Maroua.*

*En fin, je remercie toute personne ayant participé de près ou de loin à l'élaboration et l'évaluation de ce travail.*

## *Dédicaces*

Je dédie mon travail

A ma très chère maman

A mon cher papa

A ma sœur

A mon frère

A la mémoire d'une grande dame, avec un grand cœur,

A une dame qui a toujours su admirer le savoir et la connaissance,

A ma très chère grand-mère.

# *Sommaire*

**Liste des abréviations**

**Liste des figures**

**Liste des tableaux**

**Liste des photos**

**Introduction** 1

## **SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

### **Chapitre 1 : LES SULFAMIDES**

1. Découverte des sulfamides	6
2. Structure chimique	7
3. Relation structure-activité	7
4. Spectre d'activité	8
5. Mécanisme d'action	8
6. Mécanismes de résistance aux sulfamides	10
6.1. Résistance naturelle	10
6.2. Résistance acquise	10
6.2.1. Résistance plasmidique	10
6.2.2. Résistance chromosomique	11

### **Chapitre 2 : MECANISMES DE RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES**

1. Origine de la résistance bactérienne aux antibiotiques	13
2. Modes d'action des antibiotiques	15
3. Les types de résistances aux antibiotiques	17
3.1. Résistance naturelle ou intrinsèque	17
3.2. Résistance acquise	18
3.2.1. Mécanismes génétiques de la résistance acquise	18
3.2.2. Mécanismes biochimiques de la résistance acquise	21

### **Chapitre 3 : BACTERIES ETUDIEES**

1. Les bactéries à Gram positif	23
---------------------------------	----

1.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	23
1.2. <i>Enterococcus faecalis</i>	24
<b>2. Les bactéries à Gram négatif (<i>Enterobacteriaceae</i>)</b>	<b>25</b>
2.1. <i>Escherichia coli</i>	25
2.2. <i>Klebsiella pneumoniae</i> et <i>Klebsiella oxytoca</i>	26
2.3. <i>Enterobacter cloacae</i> et <i>Enterobacter aerogenes</i>	27
2.4. <i>Proteus mirabilis</i> et <i>Proteus vulgaris</i>	28
2.5. <i>Serratia marcescens</i> <i>Serratia fonticola</i> et <i>Serratia odorifera</i>	28
2.6. <i>Salmonella sp.</i>	29
2.7. <i>Citrobacter freundii</i>	30
2.8. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	31
2.9. <i>Acinetobacter baumannii</i>	32

## **Chapitre 4 : LA CYTOTOXICITE ET LA GENOTOXICITE**

<b>1. La cytotoxicité</b>	<b>34</b>
1.1. Le test d'évaluation de la cytotoxicité sur <i>Artemia salina</i>	35
<b>2. La génotoxicité</b>	<b>36</b>
2.1. Les tests de génotoxicité	39
2.1.1. Le Test d'Ames	40
2.1.2. Le SOS Chromotest	44

## **MATERIEL ET METHODES**

<b>1. MATERIEL</b>	<b>48</b>
1.1. Les souches bactériennes	48
1.2. <i>Artemia salina</i>	48
1.3. Les molécules de sulfamides testées	49
1.4. Les Antibiotiques	52
<b>2. METHODES</b>	<b>52</b>
2.1. Synthèse chimique des séries 1a-d et 2a-f	52
2.2. Techniques de prélèvements	53
2.3. Isolement des souches	53
2.4. Purification et identification des souches	55
2.4.1. Tests spécifiques aux <i>Staphylococcus aureus</i> :	55

2.4.1.1. Recherche de la staphylo-coagulase	55
2.4.1.2. Recherche de la résistance de <i>Staphylococcus aureus</i> à l'oxacilline	56
2.5. L'antibiogramme standard	57
2.6. Evaluation de l'activité des nouvelles molécules de sulfamide	58
2.6.1. Préparation des dilutions	58
2.6.2. Détermination des diamètres des zones d'inhibition	59
2.6.3. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)	60
2.6.4. Détermination de la CMI <sub>50</sub> et la CMI <sub>90</sub>	62
2.6.5. Détermination de la CMB	63
2.6.6. La cinétique d'action des molécules de sulfamides	63
2.6.7. Control de la stabilité des molécules testées	64
2.7. Evaluation de la cytotoxicité	66
2.8. Evaluation de la génotoxicité	67
2.8.1. Le test d'Ames	67
2.8.2. Le SOS ChromoTest	73
2.9. Analyse statistique	76

## RESULTATS

<b>1. Isolement et identification des souches :</b>	<b>78</b>
1.1. Répartition des souches par espèce	78
1.2. Répartition des souches selon l'établissement d'isolement	78
1.3. Répartition des souches selon l'origine du prélèvement	79
1.4. Répartition des espèces bactériennes selon le sexe	80
1.5. Répartition des souches selon l'âge des patients	81
<b>2. Antibiogramme standard:</b>	<b>82</b>
2.1. Antibiogramme standard des souches à Gram positif	82
2.1.1. Antibiogramme standard des souches de <i>S. aureus</i>	82
2.1.2. Antibiogramme standard des souches d' <i>E. faecalis</i>	85
2.2. Antibiogramme standard des souches à Gram négatif	86
2.2.1. Antibiogramme standard des souches à Gram négatif fermentaires	86
2.2.2. Antibiogramme standard des souches à Gram négatif non fermentaires	91
<b>Conclusion 1</b>	<b>93</b>

<b>3. Evaluation de l'activité antibactérienne de deux séries de sulfamides néosynthétisés</b>	<b>94</b>
3.1. Détermination des zones d'inhibition et des CMI des deux séries de sulfamides <b>1a-d</b> et <b>2a-f</b> vis-à-vis des souches de références	<b>94</b>
3.2. Détermination des zones d'inhibition des deux séries de sulfamides <b>1a-d</b> et <b>2a-f</b> vis-à-vis des souches cliniques testées	<b>97</b>
3.3. Détermination des CMI, CMI <sub>50</sub> et CMI <sub>90</sub> des deux séries de sulfamides <b>1a-d</b> et <b>2a-f</b> vis-à-vis des souches cliniques testées	<b>105</b>
3.4. Pourcentages de sensibilité aux antibiotiques standards et aux deux séries de sulfamides <b>1a-d</b> et <b>2a-f</b> des souches cliniques testées	<b>116</b>
3.5. Détermination de la CMB	<b>119</b>
3.6. La cinétique	<b>119</b>
3.7. Evaluation de la stabilité structurale et de l'activité antibactérienne des deux séries de sulfamides <b>1a-d</b> et <b>2a-f</b>	<b>120</b>
<b>Conclusion 2</b>	<b>124</b>
<b>4. Evaluation de l'effet cytotoxique par le test de létalité sur <i>Artemia salina</i></b>	<b>125</b>
<b>Conclusion 3</b>	<b>130</b>
<b>5. Evaluation de l'effet génotoxique</b>	<b>131</b>
5.1. Le test d'Ames	<b>131</b>
5.1.1. Les tests de confirmation des caractères génétiques des souches de <i>S. typhimurium</i>	<b>131</b>
5.1.2. Evaluation de l'effet génotoxique de la série de sulfamides <b>1a-d</b>	<b>133</b>
5.1.3. Evaluation de l'effet génotoxique de la série de sulfamides <b>2a-f</b>	<b>143</b>
5.1.4. Evaluation de l'effet génotoxique des deux témoins (Bactrim et Sulfaguanidine)	<b>157</b>
5.2. Les SOS Chromotest	<b>161</b>
<b>Conclusion 4</b>	<b>164</b>
<b>Discussion</b>	<b>165</b>
<b>Conclusion générale et perspectives</b>	<b>183</b>
<b>Références bibliographiques</b>	<b>186</b>
<b>Résumés</b>	
<b>Productions scientifiques</b>	
<b>Annexes</b>	



## *Liste des abréviations*

**4NQO:** 4-Nitro-o-phenylenediamine

**ADH:** Arginine dihydrolase

**API 20E:** Analytical profile index 20E (E= Entérobactéries)

**API STAPH:** Analytical profile index *Staphylococcus*

**API 20NE:** Analytical profile index 20NE (N= Non, E= Entérobactéries)

**ATCC:** American Type Culture Collection

**ATP:** Adénosine Triphosphate

**CHU:** Centre Hospitalier Universitaire

**CMI:** Concentration minimale inhibitrice

**CMB:** Concentration minimale bactéricide

**GC%:** Pourcentage en guanine + cytosine du génome

**DHPS:** dihydroptéroate synthétase

**DHPR:** dihydroptéroate réductase

**DMSO:** Dimethyl sulfoxide

**DHFR:** dihydrofolate réductase

**DS:** déviation standard

**ECBU:** Examen cytbactériologique des urines

**H<sub>2</sub>S:** Hydrogen Sulfide

**IND:** Indole

**INO:** Inositol

**LDC:** Lysine décarboxylase

**MH:** Mueller Hinton

**MOB:** mobilité

**ODC:** Ornithine Decarboxylase

**ONPG:** L'orthonitrophényl-β-galactoside

**OX:** oxydase

**PABA:** acide para-amino-benzoïque

**PDP:** Prélèvements distaux protégés

**PLP:** Protéines liant les pénicillines

**SARM:** *Staphylococcus aureus* résistant à la Méricilline

**S.I.D.A.:** syndrome d'immunodéficience acquise.

**SNC:** système nerveux central

**SOSIP:** Potentiel d'Induction SOS

**TDA:** Tryptophan Desaminase

**UFC:** unité formant colonie

**VP:** Réaction de Voges-Proskauer

## *Liste des Figures*

Numéro	Titre	Page
1	Transformation, <i>in vivo</i> , du prontosil en sulfamide	7
2	Structure chimique du sulfamide	7
3	Comparaison de la structure du sulfamide, de l'acide para-aminobenzoïque et de l'acide folique	9
4	Mécanisme d'action des sulfamides	10
5	Origine et dissémination de la résistance bactérienne aux antibiotiques	14
6	Cycle de l'apparition de la résistance aux antibiotiques	15
7	Les grandes familles d'antibiotiques ainsi que leurs modes d'action sur les bactéries à Gram positif et à Gram négatif	16
8	Mécanismes de la transformation, conjugaison et transduction	20
9	Résistance extra-chromosomique par éléments génétiques transposables et intégrons	21
10	Les différents risques génotoxiques	36
11	Activation de la prolifération cellulaire et inhibition de l'apoptose au cours du processus de cancérisation: rôle des agents initiateurs et promoteurs	37
12	Exemples de tests de génotoxicité	39
13	La mutation par substitution de paire de base de type faux sens, des souches de <i>S. typhimurium</i> TA100 et TA1535	41
14	La mutation par substitution de paire de base de type non sens, des souches de <i>S. typhimurium</i> TA100 et TA1535	41
15	La mutation frameshift (décalage du cadre de lecture) de la souche <i>S. typhimurium</i> TA98	42
16	Principe de la réponse SOS	44
17	Principe de la réponse SOS combinée à l'expression de la $\beta$ -galactosidase dans le SOS Chromotest	45
18	Détermination des diamètres des zones d'inhibition des nouvelles molécules de sulfamides <b>1a-d</b> et <b>2a-f</b>	60
19	Détermination de la CMI et la CMB des nouvelles molécules de sulfamides <b>1a-d</b> et <b>2a-f</b>	62
20	Protocole expérimental du test d'Ames, méthode de pré-incubation	72
21	Distribution des différentes concentrations des molécules <b>1a-d</b> (A) et <b>2a-f</b> (B) ainsi que les deux molécules témoins dans les microplaques du SOS Chromotest	74
22	Protocole expérimental du SOS Chromotest	77
23	Répartition des souches bactériennes isolées selon les espèces	78
24	Répartition des souches nosocomiales selon le type de prélèvement	80
25	Répartition des souches communautaires selon le type de prélèvement	80

<b>26</b>	Répartition des espèces bactériennes isolées selon le sexe des patients	<b>81</b>
<b>27</b>	Cinétiques de la CMI des sulfamides testés <b>1a-d</b> vis-à-vis des souches de <i>S. aureus</i>	<b>119</b>
<b>28</b>	Cinétiques de la CMI des sulfamides testés <b>2a-f</b> vis-à-vis des souches de <i>S. aureus</i>	<b>120</b>
<b>29</b>	Evaluation de la Stabilité des molécules <b>1a-d</b> durant la période des tests	<b>121</b>
<b>30</b>	Evaluation de la Stabilité des molécules <b>2a-f</b> durant la période des tests	<b>122</b>
<b>31</b>	Nauplii d' <i>Artemia salina</i> après éclosion	<b>125</b>
<b>32</b>	Nombre de colonies révertantes des souches <b>TA100 (a)</b> , <b>TA98 (b)</b> et <b>TA1535 (c)</b> en présence de la molécule <b>1a</b> , avec et sans activation métabolique (S9)	<b>134</b>
<b>33</b>	Nombre de colonies révertantes des souches <b>TA100 (a)</b> , <b>TA98 (b)</b> et <b>TA1535 (c)</b> en présence de la molécule <b>1b</b> , avec et sans activation métabolique (S9)	<b>137</b>
<b>34</b>	Nombre de colonies révertantes des souches <b>TA100 (a)</b> , <b>TA98 (b)</b> et <b>TA1535 (c)</b> en présence de la molécule <b>1c</b> , avec et sans activation métabolique (S9)	<b>139</b>
<b>35</b>	Nombre de colonies révertantes des souches <b>TA100 (a)</b> , <b>TA98 (b)</b> et <b>TA1535 (c)</b> en présence de la molécule <b>1d</b> , avec et sans activation métabolique (S9)	<b>142</b>
<b>36</b>	Nombre de colonies révertantes des souches <b>TA100 (a)</b> , <b>TA98 (b)</b> et <b>TA1535 (c)</b> en présence de la molécule <b>2a</b> , avec et sans activation métabolique (S9)	<b>144</b>
<b>37</b>	Nombre de colonies révertantes des souches <b>TA100 (a)</b> , <b>TA98 (b)</b> et <b>TA1535 (c)</b> en présence de la molécule <b>2b</b> , avec et sans activation métabolique (S9)	<b>147</b>
<b>38</b>	Nombre de colonies révertantes des souches <b>TA100 (a)</b> , <b>TA98 (b)</b> et <b>TA1535 (c)</b> en présence de la molécule <b>2c</b> , avec et sans activation métabolique (S9)	<b>149</b>
<b>39</b>	Nombre de colonies révertantes des souches <b>TA100 (a)</b> , <b>TA98 (b)</b> et <b>TA1535 (c)</b> en présence de la molécule <b>2d</b> , avec et sans activation métabolique (S9)	<b>151</b>
<b>40</b>	Nombre de colonies révertantes des souches <b>TA100 (a)</b> , <b>TA98 (b)</b> et <b>TA1535 (c)</b> en présence de la molécule <b>2e</b> , avec et sans activation métabolique (S9).	<b>154</b>
<b>41</b>	Nombre de colonies révertantes des souches <b>TA100 (a)</b> , <b>TA98 (b)</b> et <b>TA1535 (c)</b> en présence de la molécule <b>2f</b> , avec et sans activation métabolique (S9)	<b>156</b>
<b>42</b>	Nombre de colonies révertantes des souches <b>TA100 (a)</b> , <b>TA98 (b)</b> et <b>TA1535 (c)</b> du Bactrim ( <b>T1</b> ), avec et sans activation métabolique (S9)	<b>158</b>
<b>43</b>	Nombre de colonies révertantes des souches <b>TA100 (a)</b> , <b>TA98 (b)</b> et <b>TA1535 (c)</b> du Sulfaguanidine ( <b>T2</b> ), avec et sans activation métabolique (S9)	<b>160</b>

## *Liste des tableaux*

Numéro	Titre	Page
1	Evolution de la résistance bactérienne aux agents antibactériens majeurs	14
2	Phénotype des souches de <i>S. typhimurium</i> : TA98, TA100 et TA1535	43
3	Génotypes des souches de <i>S. typhimurium</i> : TA98, TA100 et TA1535	43
4	Structures chimiques des sulfamides 1a-d	50
5	Structures chimiques des sulfamides 2a-f	51
6	Structures chimiques des molécules témoins	52
7	Conditions pré-analytiques des prélèvements conformes au Référentiel en Microbiologie Médicale	54
8	Produits chimiques de contrôle positif pour le test d'Ames (sans activation métabolique par le S9).	71
9	Nombre de révertants spontanés de contrôle pour les souches d'essai de <i>S. typhimurium</i>	71
10	Répartition des souches selon l'établissement d'isolement	79
11	Répartition des espèces bactériennes selon l'âge des patients	82
12	Résultats de l'antibiogramme standard des souches de <i>S. aureus</i>	83
13	Résultats de l'antibiogramme standard des souches d' <i>E. faecalis</i>	85
14	Antibiogramme standard des souches d' <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>P. mirabilis</i> et <i>P. vulgaris</i>	87
15	Antibiogramme standard des souches d' <i>E. cloacae</i> et <i>E. aerogenes</i>	90
16	Antibiogramme standard des souches de <i>S. marcescens</i> , <i>S. fonticola</i> , <i>S. odorifera</i> , <i>Salmonella sp.</i> et <i>C. freundii</i>	91
17	Antibiogramme standard des souches de <i>P. aeruginosa</i> et <i>A. baumannii</i>	92
18	Valeurs des zones d'inhibition et des CMI de la série de sulfamides 1a-d vis-à-vis des souches de références	95
19	Valeurs des zones d'inhibition et des CMI de la série de sulfamides 2a-f vis-à-vis des souches de références	96
20	Moyennes des diamètres des zones d'inhibition de la série de sulfamides 1a-d vis-à-vis des souches cliniques testées	98
21	Moyennes des diamètres des zones d'inhibition de la série de sulfamides 2a-f vis-à-vis des souches cliniques testées	102
22	Détermination des CMI, CMI <sub>50</sub> et CMI <sub>90</sub> de la série de sulfamides 1a-d vis-à-vis des souches cliniques de <i>S. aureus</i> et d' <i>E. faecalis</i>	105
23	Détermination des CMI, CMI <sub>50</sub> et CMI <sub>90</sub> de la série de sulfamides 1a-d vis-à-vis des souches cliniques d' <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>P. mirabilis</i> et de <i>P. vulgaris</i>	106
24	Détermination des CMI, CMI <sub>50</sub> et CMI <sub>90</sub> de la série de sulfamides 1a-d vis-à-vis des souches cliniques d' <i>E. cloacae</i> et d' <i>E. aerogenes</i>	107

25	Détermination des CMI, CMI <sub>50</sub> et CMI <sub>90</sub> de la série de sulfamides <b>1a-d</b> vis-à-vis des souches cliniques de <i>S. marcescens</i> , <i>S. fonticola</i> , <i>S. odorifera</i> , <i>Salmonella sp.</i> et de <i>C. freundii</i>	108
26	Détermination des CMI, CMI <sub>50</sub> et CMI <sub>90</sub> de la série de sulfamides <b>1a-d</b> vis-à-vis des souches cliniques de <i>P. aeruginosa</i> et d' <i>A. baumannii</i>	109
27	Détermination des CMI, CMI <sub>50</sub> et CMI <sub>90</sub> de la série de sulfamides <b>2a-f</b> vis-à-vis des souches cliniques de <i>S. aureus</i> et d' <i>E. faecalis</i>	110
28	Détermination des CMI, CMI <sub>50</sub> et CMI <sub>90</sub> de la série de sulfamides <b>2a-f</b> vis-à-vis des souches cliniques d' <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>P. mirabilis</i> et de <i>P. vulgaris</i>	112
29	Détermination des CMI, CMI <sub>50</sub> et CMI <sub>90</sub> de la série de sulfamides <b>2a-f</b> vis-à-vis des souches cliniques d' <i>E. cloacae</i> et d' <i>E. aerogenes</i>	113
30	Détermination des CMI, CMI <sub>50</sub> et CMI <sub>90</sub> de la série de sulfamides <b>2a-f</b> vis-à-vis des souches cliniques de <i>S. marcescens</i> , <i>S. fonticola</i> , <i>S. odorifera</i> , <i>Salmonella sp.</i> et de <i>C. freundii</i>	114
31	Détermination des CMI, CMI <sub>50</sub> et CMI <sub>90</sub> de la série de sulfamides <b>2a-f</b> vis-à-vis des souches cliniques de <i>P. aeruginosa</i> et d' <i>A. baumannii</i>	116
32	Pourcentages de sensibilité aux antibiotiques standards et aux deux séries de sulfamides <b>1a-d</b> et <b>2a-f</b> des souches cliniques testées	118
33	Evaluation de la cytotoxicité des molécules <b>1a-d</b> vis-à-vis des nauplii d' <i>A. salina</i>	127
34	Evaluation de la cytotoxicité des molécules <b>2a-c</b> vis-à-vis des nauplii d' <i>A. salina</i>	128
35	Evaluation de la cytotoxicité des molécules <b>2d-f</b> vis-à-vis des nauplii d' <i>A. salina</i>	129
36	Dénombrement des colonies révertantes des souches de <i>S. typhimurium</i> <b>TA100</b> , <b>TA98</b> et <b>TA1535</b> vis-à-vis de la molécule <b>1a</b> avec et sans activation métabolique (S9)	133
37	Dénombrement des colonies révertantes des souches de <i>S. typhimurium</i> <b>TA100</b> , <b>TA98</b> et <b>TA1535</b> vis-à-vis de la molécule <b>1b</b> avec et sans activation métabolique (S9)	136
38	Dénombrement des colonies révertantes des souches de <i>S. typhimurium</i> <b>TA100</b> , <b>TA98</b> et <b>TA1535</b> vis-à-vis de la molécule <b>1c</b> avec et sans activation métabolique (S9)	138
39	Dénombrement des colonies révertantes des souches de <i>S. typhimurium</i> <b>TA100</b> , <b>TA98</b> et <b>TA1535</b> vis-à-vis de la molécule <b>1d</b> avec et sans activation métabolique (S9)	141
40	Dénombrement des colonies révertantes des souches de <i>S. typhimurium</i> <b>TA100</b> , <b>TA98</b> et <b>TA1535</b> vis-à-vis de la molécule <b>2a</b> avec et sans activation métabolique (S9)	143
41	Dénombrement des colonies révertantes des souches de <i>S. typhimurium</i> <b>TA 100</b> , <b>TA98</b> et <b>TA1535</b> vis-à-vis de la molécule <b>2b</b>	146

	avec et sans activation métabolique (S9)	
<b>42</b>	Dénombrement des colonies révertantes des souches de <i>S. typhimurium</i> <b>TA100, TA98 et TA1535</b> vis-à-vis de la molécule <b>2c</b> avec et sans activation métabolique (S9)	<b>148</b>
<b>43</b>	Dénombrement des colonies révertants des souches de <i>S. typhimurium</i> <b>TA100, TA98 et TA1535</b> vis-à-vis de la molécule <b>2d</b> avec et sans activation métabolique (S9)	<b>150</b>
<b>44</b>	Dénombrement des colonies révertantes des souches de <i>S. typhimurium</i> <b>TA100, TA98 et TA1535</b> vis-à-vis de la molécule <b>2e</b> avec et sans activation métabolique (S9)	<b>153</b>
<b>45</b>	Dénombrement des colonies révertantes des souches de <i>S. typhimurium</i> <b>TA100, TA98 et TA1535</b> vis-à-vis de la molécule <b>2f</b> avec et sans activation métabolique (S9)	<b>155</b>
<b>46</b>	Dénombrement des colonies révertantes des souches de <i>S. typhimurium</i> <b>TA 100, TA98 et TA1535</b> vis-à-vis de la molécule témoin 1 (Bactrim) avec et sans activation métabolique (S9)	<b>157</b>
<b>47</b>	Dénombrement des colonies révertantes des souches de <i>S. typhimurium</i> <b>TA100, TA98 et TA1535</b> vis-à-vis de la molécule témoin 2 (Sulfaguanidine) avec et sans activation métabolique (S9)	<b>159</b>
<b>48</b>	Résultats du SOSIP des sulfamides <b>1a-d</b> et <b>2a-f</b> ainsi que des deux molécules témoins (Bactrim et Sulfaguanidine)	<b>163</b>

## *Liste des Photos*

Numéro	Titre	Page
1	Antibiogramme standard d'une souche nosocomiale de <i>S. aureus</i>	84
2	Screening test d'une souche de <i>S. aureus</i> résistante à la Métilcilline (MRSA)	84
3	Antibiogramme standard d'une souche communautaire d' <i>E. coli</i>	88
4	Antibiogramme standard d'une souche nosocomiale de <i>K. pneumoniae</i>	88
5	Antibiogramme standard d'une souche nosocomiale de <i>P. aeruginosa</i>	93
6	Zones d'inhibition d'une souche nosocomiale de <i>S. aureus</i> à différentes concentrations ( $\mu\text{g/ml}$ ) de la molécule de sulfamide <b>1a</b>	98
7	Zones d'inhibition d'une souche nosocomiale d' <i>E. faecalis</i> à différentes concentrations ( $\mu\text{g/ml}$ ) de la molécule de sulfamide <b>1a</b>	99
8	Zones d'inhibition d'une souche communautaire d' <i>E. coli</i> à différentes concentrations ( $\mu\text{g/ml}$ ) de la molécule de sulfamide <b>1b</b>	99
9	Zones d'inhibition d'une souche communautaire de <i>P. aeruginosa</i> à différentes concentrations ( $\mu\text{g/ml}$ ) de la molécule de sulfamide <b>1c</b>	99
10	Diamètre de la zone d'inhibition d'une souche communautaire d' <i>A. baumannii</i> (22 mm) par le sulfamide <b>1c</b> à concentration $1\mu\text{g/ml}$	100
11	Diamètre de la zone d'inhibition d'une souche nosocomiale de <i>Salmonella sp.</i> (20 mm) par sulfamide <b>1d</b> à concentration $16\mu\text{g/ml}$	100
12	Diamètre de la zone d'inhibition d'une souche nosocomiale de <i>P. mirabilis</i> (19mm) par le sulfamide <b>1b</b> à concentration $32\mu\text{g/ml}$	100
13	Diamètre de la zone d'inhibition d'une souche nosocomiale de <i>P. vulgaris</i> (18mm) par le sulfamide <b>1d</b> à concentration $16\mu\text{g/ml}$	100
14	Diamètre de la zone d'inhibition d'une souche communautaire de <i>S. marcescens</i> (21mm) par le sulfamide <b>1c</b> à concentration $32\mu\text{g/ml}$	100
15	Zones d'inhibition d'une souche nosocomiale de <i>S. aureus</i> à différentes concentrations ( $\mu\text{g/ml}$ ) de la molécule de sulfamide <b>2a</b>	102
16	Zones d'inhibition d'une souche nosocomiale d' <i>E. faecalis</i> à différentes concentrations ( $\mu\text{g/ml}$ ) de la molécule de sulfamide <b>2d</b>	103
17	Zones d'inhibition d'une souche communautaires d' <i>E. coli</i> à différentes concentrations ( $\mu\text{g/ml}$ ) de la molécule de sulfamide <b>2c</b>	103
18	Zones d'inhibition d'une souche communautaires de <i>P. aeruginosa</i> à différentes concentrations ( $\mu\text{g/ml}$ ) de la molécule de sulfamide <b>2b</b>	103
19	Diamètre de la zone d'inhibition d'une souche nosocomiale d' <i>A. baumannii</i> (24mm) par le sulfamide <b>2a</b> à concentration $2\mu\text{g/ml}$	104
20	Diamètre de la zone d'inhibition d'une souche communautaire de <i>C. freundii</i> (21mm) par le sulfamide <b>2b</b> à concentration $8\mu\text{g/ml}$	104
21	Diamètre de la zone d'inhibition d'une souche nosocomiale de <i>Salmonella sp.</i> (21mm) par le sulfamide <b>2f</b> à concentration $4\mu\text{g/ml}$	104



22	Diamètre de la zone d'inhibition d'une souche communautaire de <i>P. vulgaris</i> (22mm) par le sulfamide <b>2b</b> à concentration 2µg/ml	104
23	Diamètre de la zone d'inhibition d'une souche communautaire de <i>P. mirabilis</i> (24mm) par le sulfamide <b>2a</b> à concentration 1µg/ml	104
24	Diamètre de la zone d'inhibition d'une souche nosocomiale de <i>S. marcescens</i> (23mm) par le sulfamide <b>2b</b> à concentration 2µg/ml	104
25	Profil CCM des molécules de sulfamide <b>1a-d</b>	123
26	Profil CCM des molécules de sulfamide <b>2a-f</b>	123
27	Test de la réclamation de l'histidine des souches <b>TA100, TA98, TA1535</b> et de la souche sauvage de <i>Salmonella sp.</i>	132
28	Test de la résistance à l'ampicilline et de la sensibilité au cristal violet de la souche <b>TA100</b>	132
29	Test de la résistance à l'ampicilline et de la sensibilité au cristal violet de la souche <b>TA98</b>	132
30	Test de la résistance à l'ampicilline et de la sensibilité au cristal violet de la souche <b>TA1535</b>	132
31	Test de la sensibilité aux UV des souches <b>TA100, TA98</b> et de la souche sauvage de <i>Salmonella sp.</i>	132
32	Test de la sensibilité aux UV de la souche <b>TA1535</b> et de la souche sauvage de <i>Salmonella sp.</i>	132
33	Nombre de colonies révertantes de la souche <b>TA100</b> à concentration 512 µg/ml de la molécule <b>1a</b> , sans ( <b>a</b> ) et avec ( <b>b</b> ) activation métabolique	135
34	Nombre de colonies révertantes de la souche <b>TA98</b> à concentration 512 µg/ml de la molécule <b>1a</b> , sans ( <b>a</b> ) et avec ( <b>b</b> ) activation métabolique	135
35	Nombre de colonies révertantes de la souche <b>TA1535</b> à concentration 512 µg/ml de la molécule <b>1a</b> , sans ( <b>a</b> ) et avec ( <b>b</b> ) activation métabolique	135
36	Nombre de colonies révertantes de la souche <b>TA100</b> à concentration 512 µg/ml de la molécule <b>1c</b> , sans ( <b>a</b> ) et avec ( <b>b</b> ) activation métabolique	140
37	Nombre de colonies révertantes de la souche <b>TA98</b> à concentration 512 µg/ml de la molécule <b>1c</b> , sans ( <b>a</b> ) et avec ( <b>b</b> ) activation métabolique	140
38	Nombre de colonies révertantes de la souche <b>TA1535</b> à concentration 512 µg/ml de la molécule <b>1c</b> , sans ( <b>a</b> ) et avec ( <b>b</b> ) activation métabolique	140
39	Nombre de colonies révertantes de la souche <b>TA100</b> à concentration 1 µg/ml de la molécule <b>2a</b> , sans ( <b>a</b> ) et avec ( <b>b</b> ) activation métabolique	145
40	Nombre de colonies révertantes de la souche <b>TA98</b> à concentration 2 µg/ml de la molécule <b>2a</b> , sans ( <b>a</b> ) et avec ( <b>b</b> ) activation métabolique	145
41	Nombre de colonies révertantes de la souche <b>TA1535</b> à concentration 2 µg/ml de la molécule <b>2a</b> , sans ( <b>a</b> ) et avec ( <b>b</b> ) activation métabolique	145
42	Nombre de colonies révertantes de la souche <b>TA100</b> à concentration 512 µg/ml de la molécule <b>2d</b> , sans ( <b>a</b> ) et avec ( <b>b</b> ) activation métabolique	152
43	Nombre de colonies révertantes de la souche <b>TA98</b> à concentration	152

	512 µg/ml de la molécule <b>2d</b> , sans <b>(a)</b> et avec <b>(b)</b> activation métabolique	
<b>44</b>	Nombre de colonies révertantes de la souche <b>TA1535</b> à concentration 0,5 µg/ml de la molécule <b>2d</b> , sans <b>(a)</b> et avec <b>(b)</b> activation métabolique	<b>152</b>
<b>45</b>	Résultats du SOS Chromotest de la série de sulfamides <b>1a-d</b>	<b>162</b>
<b>46</b>	Résultats du SOS Chromotest de la série de sulfamides <b>2a-f</b>	<b>162</b>

*Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Biochimie et Microbiologie Appliquées, Université Badji Mokhtar-Annaba.*

*Avec la collaboration du Laboratoire de Chimie Organique Appliquée, Université Badji Mokhtar-Annaba.*

*Cette thèse a bénéficié d'un projet de recherche PNR n° 155, intitulé :*

***Evaluation de l'activité antibactérienne et de l'effet génotoxique d'une nouvelle classe d'hétérocycles contenant un groupement sulfonyl.***

*« Dans la vie, rien n'est à craindre, tout est à comprendre ».*

*Marie Curie*



# ***INTRODUCTION***

Découvert par hasard au début du XX<sup>ème</sup> siècle, les antibiotiques ont révolutionné le traitement des maladies infectieuses suite à leur introduction en thérapeutique antibactérienne.

Les premiers anti-infectieux furent les sulfamides et la pénicilline G, ensuite il y a eu toute une gamme d'antibiotiques (**Patrick, 2003**).

Au fil des années, le développement de la résistance aux agents antibactériens est devenue une préoccupation croissante dans le monde. Les bactéries sont capables de s'adapter rapidement à un nouvel environnement, notamment à la présence d'antibiotiques. Leur matériel génétique évolue et se diversifie, des germes résistants sont sélectionnés et les traitements deviennent alors inefficaces. Ces dernières années, les bactéries pathogènes pour l'homme sont devenues, majoritairement, résistantes aux traitements antibiotiques (**Schwaber, 2007**).

L'émergence de la résistance chez les bactéries à Gram positif et principalement chez *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) et les entérocoques est préoccupante. L'incidence de la résistance de ces bactéries pathogènes a conduit à une augmentation des taux de morbidité, de mortalité et des coûts des soins (**Oliphant et Eroschenko, 2015**).

*S. aureus* est responsable de plusieurs infections cutanées, de pneumopathies, de bactériémies et de septicémies. Elle fait partie des bactéries résistantes les plus fréquemment isolées en cliniques. Cependant, l'épidémiologie de *S. aureus* est en train de changer en raison de sa capacité d'adaptation à des conditions environnementales variables. De nouvelles souches acquises dans la collectivité, qui diffèrent des souches nosocomiales dans leur sensibilité à divers antibiotiques, sont apparues. *S. aureus* sont rapidement devenues résistantes à plusieurs antibiotiques, tels que la méthicilline (SARM: *S. aureus* résistant à la méthicilline), et plus récemment à la vancomycine (VRSA: *S. aureus* résistant à la vancomycine), qui représentait auparavant le traitement de choix (**Becheker et al., 2014**).

Outre *S. aureus*, on note l'émergence d'autres bactéries à Gram positif. En effet, les entérocoques sont responsables de plusieurs infections nosocomiales. Leur résistance aux antibiotiques est volontiers attribuée à l'existence chez ces bactéries de résistances naturelles multiples aux antibiotiques dont les céphalosporines, les aminosides, la clindamycine, les fluoroquinolones et à l'activité médiocre des macrolides et de l'association triméthoprime-sulfaméthoxazole *in vivo*. À ces résistances naturelles s'ajoutent des résistances acquises aux trois principales classes d'antibiotiques utilisés dans le traitement des infections à entérocoque (**Leclercq, 2002**).

Les entérobactéries sont parmi les souches les plus fréquemment isolées chez les patients hospitalisés. Elles sont souvent responsables d'infections urinaires, pulmonaires, de septicémies mais également d'autres infections intra-abdominales.

*E. coli* est également une cause fréquente d'infections urinaires acquises en milieu communautaire. *P. aeruginosa* et *A. baumannii* sont des pathogènes opportunistes, souvent responsables d'infections pulmonaires et de bactériémies sévères, notamment dans les unités de soins intensifs. Ces infections nosocomiales sont à l'origine de mortalité et de morbidité élevées partout dans le monde, un problème aggravé lorsque ces bactéries acquièrent des gènes de résistance aux antibiotiques (**Baba Ahmed-Kazi Tani et Arlet, 2014**).

Bien que considérable, l'arsenal de molécules antibactériennes disponible, ne répond pas à tous les problèmes posés. A l'heure actuelle nous faisons face à des problèmes majeurs de santé publique qui ont soulevés de graves préoccupations au niveau international: la multirésistance des bactéries pathogènes nosocomiales et communautaires et la pénurie d'antibiotiques (**Desnottes, 1999 ; Cattoir et Daurel, 2010**). Le besoin permanent du développement de nouveaux antibiotiques pour le traitement des infections bactériennes sévères est évident. En effet, dès qu'une nouvelle molécule est utilisée en pratique clinique, la résistance ne tarde pas à émerger dans les années qui suivent (**Cattoir et Daurel, 2010**).

A titre d'exemple, les premières résistances pour la pénicilline, découverte en 1943, ont été observées en 1946. Les sulfamides découverts en 1930, ont vu l'apparition de la résistance en 1940. Pire encore, la céphalosporine découverte en 1960 a vue l'apparition de la résistance à cette même année (**Palumbi, 2001**).

Face à cette pénurie d'antibiotiques, nous avons un besoin urgent de nouvelles molécules antibactériennes avec un mécanisme d'action innovant, pouvant garantir sur une durée plus longue, une activité antibactérienne efficace et ayant un meilleur profil de toxicité (**Grare et al., 2010 ; Suresha et al., 2011**).

L'introduction des sulfamides dans les années 1930 a été considérée comme une importante révolution dans le traitement des maladies infectieuses (**Grare et al., 2010**). Leur importance a été réalisée lorsque le sulfonamide, un analogue clé du sulfonamide, a été rapporté pour être le premier médicament antibactérien (**Ponka, 2006 ; Loudon, 2008**).

Les sulfonamides et leurs dérivés attirent continuellement l'attention des chimistes médicaux vue leur multiples activités biologiques (**Ponka, 2006 ; Loudon, 2008**), Ils ont été les premiers agents chimiothérapeutiques efficaces utilisés systématiquement pour la prévention et le

traitement d'un large éventail de maladies bactériennes chez l'homme et certains animaux (**Grare et al., 2010 ; Ozbek et al., 2012 ; Jain et al., 2013**), principalement en raison de leur faible coût, une faible toxicité et une excellente activité contre les bactéries pathogènes (**Papich et Riviere, 2009**).

Plus tard, de nombreux dérivés de sulfonamides ont été synthétisés, caractérisés et testés pour leur pouvoir antibactérien, anti-tumoral (**Anand et Wolff, 1996 ; Melagraki et al., 2006**), anti-inflammatoire, diurétique (**Grare et al., 2010**), et hypoglycémiant (**El-Sayed et al., 2011 ; Berredjem et al., 2015**). Ainsi, grâce à leurs multiples activités biologiques, les sulfamides constituent une classe thérapeutique importante. L'action synergique des sulfamides avec le triméthoprime a provoqué une énorme utilisation des sulfamides durant cette dernière décennie (**Ozbek et al., 2007**).

De nos jours de nombreuses firmes de biotechnologie ainsi que de nombreux scientifiques et chercheurs s'investissent dans la recherche de nouvelles molécules efficaces et sans danger pour la santé humaine. En effet, Il apparaît chaque année entre 300 à 450 nouvelles molécules (**Binet, 2001**). Afin de valider ces nouvelles molécules, les chercheurs ont recours à plusieurs tests d'évaluation recommandés par plusieurs organismes sanitaires (**Binet et Rihin, 2001**), à savoir, les tests d'évaluation de l'activité biologique *in vitro* et *in vivo*.

L'évaluation de l'activité biologique d'une nouvelle molécule d'antibiotiques commence par l'évaluation de l'activité antibactérienne qui se fait sur des souches cliniques ainsi que des souches de références. Cette évaluation se fait qualitativement en mesurant les diamètres des zones d'inhibition, et quantitativement en déterminant les CMI et les CMB. Ensuite, plusieurs autres paramètres peuvent être déterminés tel que les paramètres toxicologiques.

Les médicaments sont un exemple poignant dans l'étude de la toxicologie. Bien que thérapeutiques et très bénéfiques à certaines doses, ils ne sont pas sans effets secondaires délétères et peuvent être mortels à des doses plus élevées. La question de la relation dose-réponse est fondamentale à la toxicologie. De ce fait, les chercheurs ont recours à plusieurs tests afin de valider ces nouvelles molécules (**Timbrell, 2000 ; Hodgson, 2004**).

L'évaluation du potentiel cytotoxique et génotoxique de molécules nouvellement synthétisées constitue l'une des étapes préliminaires très importantes dans le cadre de l'évaluation de la sécurité préclinique et le contrôle réglementaire des produits chimiques (**Binet, 2001**).

La mesure de substances toxiques et la toxicité en général, est un aspect important portant principalement sur la chimie analytique, les essais biologiques et les mathématiques appliquées



qui sont conçus pour fournir la méthodologie à répondre à certaines questions d'une importance cruciale. Est-ce qu'une substance est susceptible d'être toxique? Quel est sa composition chimique? Comment pouvons-nous mesurer son effet toxique, et quel est le niveau minimum auquel cet effet toxique peut être détecté? (Hodgson, 2004).

Les tests de toxicité impliquent l'utilisation de systèmes vivants pour estimer l'activité biologique ainsi que les effets toxiques. Ils couvrent toute la gamme de tests à court terme pour la génotoxicité tel que le test d'Ames, ainsi que les différentes techniques de cultures cellulaires tel que le test de létalité sur *Artemia salina* (*A. salina*), jusqu'à l'utilisation des animaux pour les tests de toxicité aiguë à toxicité chronique à long terme (Hodgson, 2001).

Le crustacé marin *A. salina* (crevettes de saumure) est un invertébré qui a été largement utilisé pour les études de l'écotoxicologie, de la toxicologie générale des produits chimiques (Cleavers, 2003) ainsi que de composés naturels (Caldwell et al., 2003 ; Latha et al., 2007).

La bioactivité et la cytotoxicité sont déterminées par l'évaluation de la létalité des nauplii (larves d'*A. salina*) en mesurant la CL50 (la concentration létale qui tue 50% de crustacés). C'est un test qui a été développé par Michael et al., (1956) et adaptée par Meyer et al., (1982). Il s'agit d'un essai pratique pour l'évaluation préliminaire de la toxicité vue l'importante sensibilité d'*A. salina* à une grande variété de substances chimiques (Latha et al., 2007).

Une fois que les molécules sont évaluées pour leur potentiel cytotoxique, une batterie de tests biologiques spécifiques et plus sophistiqués pourrait alors être utilisée dont les tests de génotoxicité.

Les tests de génotoxicité sont effectués afin de mettre en évidence un éventuel endommagement de l'ADN qui est considéré comme l'initiateur par lequel une molécule peut causer des effets héréditaires (des mutations ponctuelles ou des altérations chromosomiques) et le cancer (Flamand et al., 2001). Ainsi, l'évaluation du potentiel génotoxique de molécules nouvellement synthétisées constitue l'une des étapes préliminaires très importantes dans le cadre de l'évaluation de la sécurité préclinique et le contrôle réglementaire des produits chimiques. L'évaluation de la génotoxicité se fait principalement par des essais *in vitro* (Li et al., 2013).

Le test de mutagenicité ou le test d'Ames est un test de mutation bactérienne inverse spécifiquement conçu pour détecter un large éventail de substances chimiques qui peuvent produire des dommages génétiques qui conduisent à des mutations au niveau des gènes. Le test emploie plusieurs souches de *salmonella* histidine dépendantes ; chaque souche porte des mutations différentes dans différents gènes de l'opéron de l'histidine. Ces mutations agissent

comme des points chauds pour les substances mutagènes qui causent des dommages de l'ADN par des mécanismes différents (**Mortelmans et Zeiger, 2000**).

Le test d'Ames est le test le plus largement utilisé, il a joué un rôle crucial dans la propagation des tests bactériens (**Quillardet et Hofnung, 1985**).

Au cours de la dernière décennie un autre test basé sur la capacité d'un mutagène à induire la réparation de l'ADN par le système SOS a également été utilisé à des fins de dépistage de composés génotoxiques. Le SOS Chromotest est un dosage colorimétrique quantitatif des génotoxines décrit par **Quillardet et al., (1982)**.

L'objectif de notre travail est l'évaluation de l'activité antibactérienne, de l'effet cytotoxique et du potentiel génotoxique de deux séries de sulfamides nouvellement synthétisées.

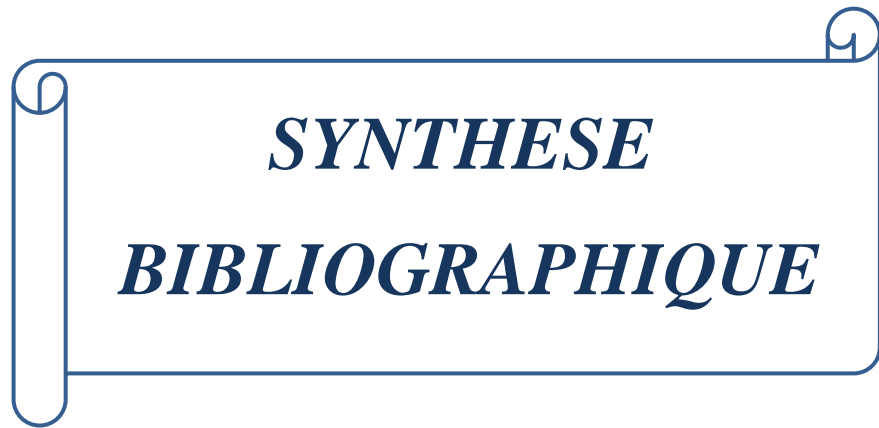
La première partie de notre travail porte sur l'étude de la résistance aux antibiotiques standards des souches cliniques isolées (hospitalières et communautaires).

La deuxième partie porte sur l'évaluation de l'activité antibactérienne des nouvelles molécules de sulfamide. Ces différents points ont été étudiés :

- Les diamètres des zones d'inhibition.
- La concentration minimale inhibitrice (CMI).
- La concentration minimale bactéricide (CMB).
- La cinétique d'action des molécules.
- La stabilité structurale et fonctionnelle des molécules.

La troisième partie porte sur l'évaluation, *in vitro*, des différents risques toxiques à savoir :

- L'évaluation de l'effet cytotoxique sur *Artemia salina*.
- L'évaluation de l'effet génotoxique par le test d'Ames et le SOS Chromotest.



***SYNTHESE***  
***BIBLIOGRAPHIQUE***

*Chapitre 1 :*  
***LES SULFAMIDES***

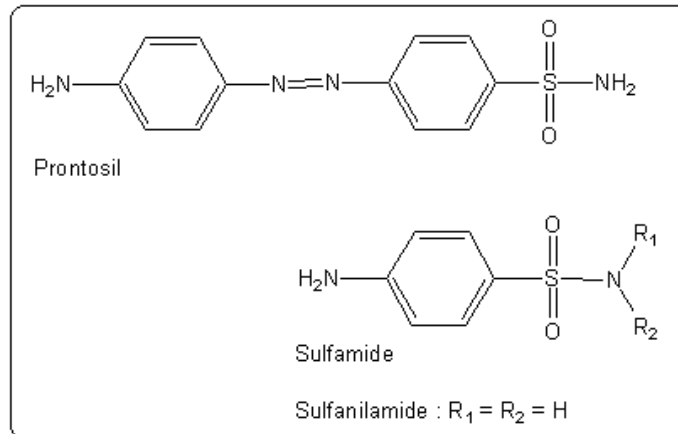
## **1. Découverte des sulfamides :**

Lorsque le rôle des bactéries dans les maladies infectieuses a été établi à la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle, deux approches de traitement ont été proposées. La première et la plus fréquente, était une série de tentatives d'attaque des bactéries par des techniques d'immunisation passive ou active (vaccination), connue sous le nom d'immunothérapie. La deuxième approche, totalement différente, a été la chimiothérapie, un terme qui a été utilisé pour la première fois par l'un de ses plus grands promoteurs, Paul Ehrlich (1854 - 1915).

Toutefois, Ehrlich a eu un succès limité dans sa recherche de la solution miracle, mais son raisonnement qui consistait à administrer sous forme de médicament un colorant, a permis de mettre en évidence le fait qu'il pourrait y avoir un lien entre la bactériologie et les colorants utilisés dans le textile (**Leopold et Koss, 2005 ; Loudon, 2008**).

Influencé par ces travaux, Gerhard Domagk (1895- 1965), a testé, *in vivo*, un nouveau colorant rouge contenant un groupe sulfonamide sur des souris infectées par des streptocoques. Il a injecté une dose de Streptocoques virulents (*Streptococcus pyogenes*) à vingt-six souris ; quatorze souris ont été conservées comme témoins, et douze souris ont été traitées, une heure et demie après l'infection par *S. pyogenes*, avec une dose unique de la nouvelle teinte rouge. Les souris témoins sont mortes quatre jours après l'infection, alors que toutes les souris ayant reçu le colorant rouge ont survécu. Il fut alors prouvé que ce colorant était bio-transformé par les bactéries présentes dans l'intestin grêle de l'animal, ce qui libérait un produit de dégradation appelé sulfanilamide (Figure 1). C'était donc à la présence de ce composé que l'on devait attribuer l'action antibactérienne. Le colorant rouge a été appelé Prontosil Rubrum (**Domagk, 1935**), ou sulfamidochrysoïdine, qui était le premier exemple d'un promédicament (**Patrick, 2003**). L'observation de son effet secondaire hypoglycémiant a été à l'origine du développement des sulfamides antidiabétiques (**Sébastien, 2009**).

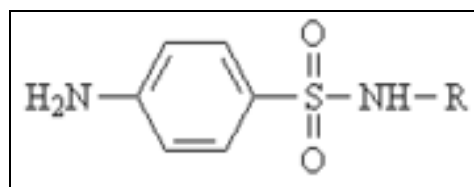
Cette découverte des sulfamides par le savant allemand Gerhard Domagk en Décembre 1932, lui a valu un prix Nobel en 1939 (**Leopold et Koss, 2005**).



**Figure 1 :** Transformation, *in vivo*, du prontosil en sulfamide (Patrick, 2003).

## 2. Structure chimique :

Les sulfamides (appelés aussi sulfonamides), constituent le meilleur exemple de substances antibactériennes fonctionnant en tant qu'anti-métabolites (Sköld O., 2001). Ce sont des dérivés de l'acide para-aminobenzène-sulfonique, dans lesquels, sont indispensables à l'activité antibactérienne la présence d'une fonction amine libre et d'un soufre substituant directement le benzène (Figure 2) (Patrick, 2003).



**Figure 2 :** Structure chimique du sulfamide (Patrick, 2003).

## 3. Relation structure-activité :

La synthèse d'un nombre élevé d'analogues de type sulfamide a permis de mettre en évidence les propriétés suivantes :

- Le groupe amino en *para* est déterminant pour l'activité et il ne peut pas être substitué, c'est-à-dire que R<sub>1</sub> est un H (hydrogène). La seule exception est lorsque R est un groupe acyl c'est-à-dire qu'il s'agit d'amides. Les amides sont, comme tels, inactifs mais ils peuvent être métabolisés par l'organisme humain de manière à générer *in situ* le composé actif. Ainsi donc les amides peuvent servir de promédicaments des sulfamides.
- Le cycle benzénique avec son groupe fonctionnel sulfonamide est indispensable.

- Le cycle benzénique ne peut être substitué qu'en position *para*.
- L'azote du groupe sulfonamide doit être secondaire.
- R2 est le seul endroit de ces sulfonamides qui puisse être modifié (**Patrick, 2003**).

#### **4. Spectre d'activité :**

Les sulfamides sont des antibiotiques bactériostatiques synthétiques à spectre large, actifs contre pratiquement toutes les bactéries à Gram positif et de nombreuses bactéries à Gram négatif. Cependant, la plupart de ces dernières ont développé une résistance aux sulfamides, c'est pourquoi ces antibiotiques sont réservés à des cas très spécifiques (infections urinaires, affections à méningocoques) et pour prévenir les fièvres rhumatismales (**Yala et al., 2001**).

Les sulfamides sont actifs sur :

- Des bactéries à Gram positif telles que : *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus anthracis*, *Clostridium perfringens* ...
- Des bactéries à Gram négatif telles que : les entérobactéries, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas*, *Vibrio cholerae*, *Legionella*, *Brucella* ...
- Des parasites tels que *Toxoplasma gondii*, plasmodium, ainsi que certains champignons (**Bryskier, 1999 ; Yala et al., 2001**).
- Les bactéries auxotrophes pour l'acide folique sont résistantes naturellement aux sulfamides exemples : Entérocoques, Lactobacilles (**Bryskier, 1999**).
- Certaines souches bactériennes ont développé une résistance au cours des traitements tels que les Streptocoques à Gram positif ; d'autres bactéries à Gram négatif ont acquis une résistance plasmidique telles que *Neisseria gonorrhoeae* et *Neisseria meningitidis* (**Bryskier, 1999**).

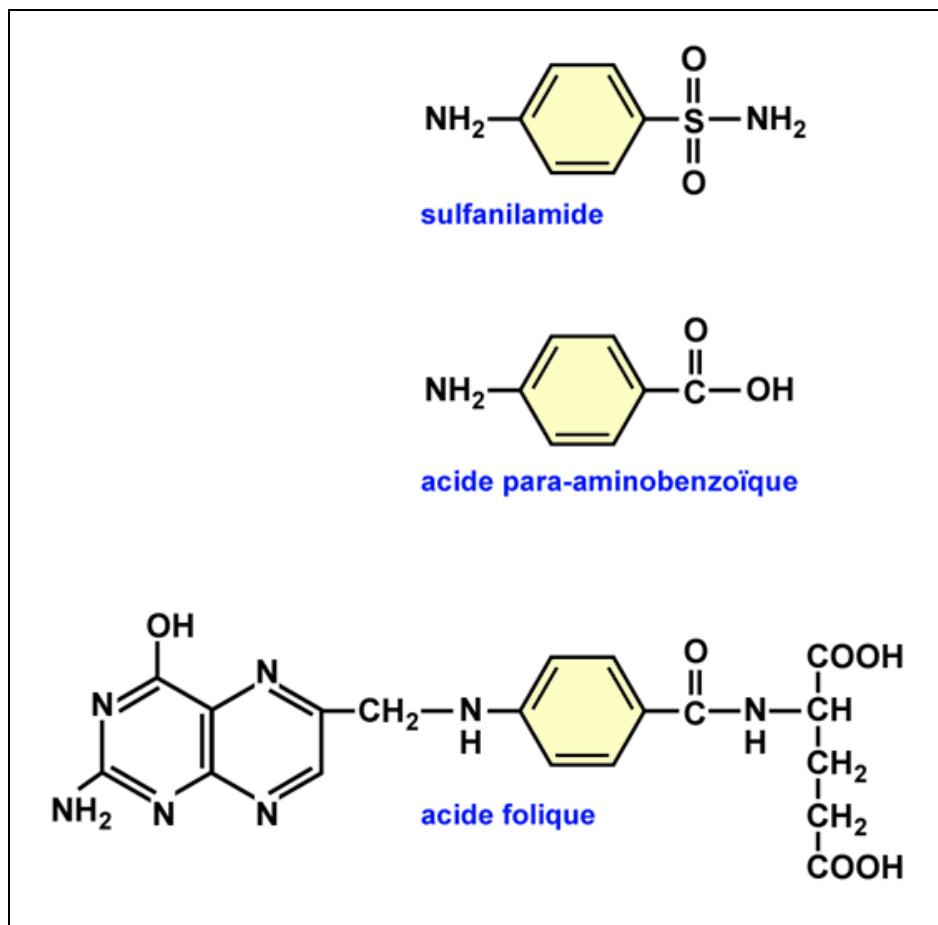
#### **5. Mécanisme d'action :**

Les sulfonamides, en tant qu'analogues de l'acide para-amino-benzoïque par leur groupe sulfanilamide, agissent en tant qu'inhibiteurs compétitifs d'une enzyme et empêchent ainsi la biosynthèse de l'acide folique dans les cellules bactériennes (Figure 3). Ils exercent cet effet en inhibant la dihydroptéroate-synthétase (DHPS) qui intervient lors de l'assemblage de certains composants de l'acide folique. Les conséquences sont néfastes pour le micro-organisme.

Dans les conditions normales, l'acide folique est le précurseur du tétrahydrofolate, une forme active dont le rôle est déterminant pour le bon fonctionnement biochimique de la cellule. En effet, le tétrahydrofolate est un transporteur d'entités monocarbonées qui sont indispensables

dans de nombreuses biosynthèses dont celles aboutissant aux purines et pyrimidines. Si le tétrahydrofolate ne peut être synthétisé, cela signifie que toutes les biosynthèses, quelle qu'elles soient et qui impliquent l'intervention de ces entités monocarbonées, sont bloquées. C'est ainsi que la voie de synthèse des acides nucléiques est complètement interrompue, ce qui se traduit par l'arrêt de la croissance et de la division des micro-organismes (Figure 4) (Sköld, 2003; Sébastien, 2009).

Les sulfonamides se comportent comme des inhibiteurs en jouant le rôle de faux substrats, en imitant l'acide para-aminobenzoïque (PABA), qui est un des composants normaux de l'acide folique. La structure de la molécule de sulfonamide ressemble tellement à celle du PABA que l'enzyme est dupée et accepte cette substance dans son site actif. Une fois lié, le sulfonamide empêche le PABA de venir s'y loger. De ce fait, l'acide folique ne peut plus être synthétisé et comme cet acide est essentiel à la croissance des cellules, celles-ci voient leurs divisions bloquées (Sköld, 2003).



**Figure 3 :** Comparaison de la structure du sulfamide, de l'acide para-aminobenzoïque et de l'acide folique (Web 1).



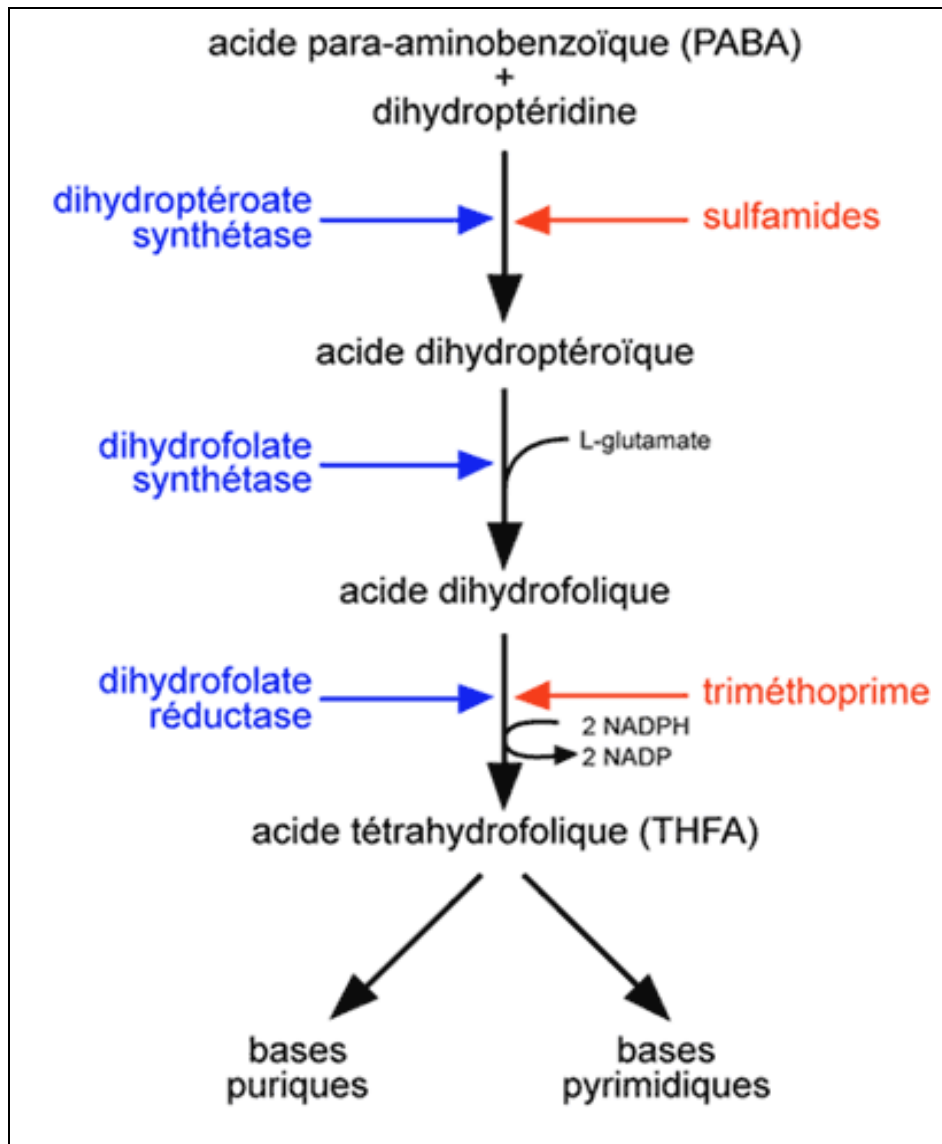


Figure 4 : Mécanisme d'action des sulfamides (Doublet, 2004).

## 6. Mécanismes de résistance aux sulfamides :

### 6.1. Résistance naturelle :

Les bactéries auxotrophes pour l'acide folique (*Enterococcus faecalis* et les Lactobacilles) sont naturellement résistantes aux sulfamides (Teichmann et al., 2014).

### 6.2. Résistance acquise :

#### 6.2.1. Résistance plasmidique :

La dernière décennie a connue la propagation horizontale de gènes de résistance exprimant des variantes d'enzymes cibles DHPS, insensibles aux sulfamides. Deux gènes, *sul1* et *sul2*, portés

par des transposons et des plasmides et exprimant des DHPS hautement résistantes aux sulfamides, ont été trouvés.

Le gène *sul1* se trouve principalement liée à d'autres gènes de résistance portés par des intégrons de classe 1, tandis que *sul2* est généralement situé sur de petits plasmides appartenant à la famille *IncQ* (RSF 1010) (Sköld, 2001 ; Blahna et al., 2006 ; Teichmann et al., 2014).

### **6.2.2. Résistance chromosomique :**

Il existe de nombreux exemples de résistance chromosomique aux sulfamides, avec divers degrés de complexité, allant des simples changements de bases dans les gènes cibles aux échanges par transformation et recombinaison de gènes entiers ou de parties de gènes, formant des structures de gènes en mosaïque (Sköld, 1976 ; Sköld, 2001).

A partir de ces mécanismes moléculaires on peut distinguer plusieurs types de résistance :

#### **➤ Hyper production de PABA :**

Les sulfamides sont des inhibiteurs compétitifs vis-à-vis de la DHPS et comme tel, l'effet est réversible. Ceci est démontré par certains micro-organismes comme les staphylocoques, les pneumocoques et les gonocoques qui peuvent acquérir une résistance en synthétisant davantage de PABA. Plus la concentration de PABA est élevée dans la cellule, plus grande sera l'efficacité de cette molécule dans sa compétition avec le sulfamide inhibiteur pour s'ancrer dans le site actif de l'enzyme (Patrick, 2003).

#### **➤ Diminution de la perméabilité :**

La diminution de l'entrée d'un antibiotique dans l'espace intracellulaire d'une bactérie, constitue la première ligne de défense lorsqu'elle est exposée à un de ces agents toxiques. Cette propriété peut résulter en une habileté intrinsèque qu'à un groupe de bactéries à induire une résistance (Patrick, 2003).

#### **➤ Diminution de l'affinité des sulfamides pour la DHPS :**

La résistance chromosomique par des mutations dans le gène de la DHPS est un mécanisme très important. Il est lié à une mutation spontanée du gène de la DHPS (*folP*) ce qui provoque la modification qualitative de cette dernière, qui augmente son affinité à l'enzyme PABA de 10 fois. Cette résistance a été observée chez *E. coli*, *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* et ainsi que d'autres espèces bactériennes et fongiques (Sköld, 2003 ; Alifrangis et al., 2009).

➤ **Modification de la cible des sulfamides :**

La substitution de cible est un des mécanismes de résistance observés avec les sulfamides et le triméthoprim. Il résulte de l'acquisition de plasmides codant pour une DHPS ou une dihydrofolate réductase (DHPR), ayant un rôle physiologique identique à celui des enzymes codées par le chromosome mais insensibles à l'agent antibactérien. Ces bactéries produisent donc des enzymes chromosomiques sensibles et des enzymes plasmidiques résistantes (**Sköld, 1976**).

*Chapitre 2 :*  
***MECANISMES DE RESISTANCE AUX  
ANTIBIOTIQUES***

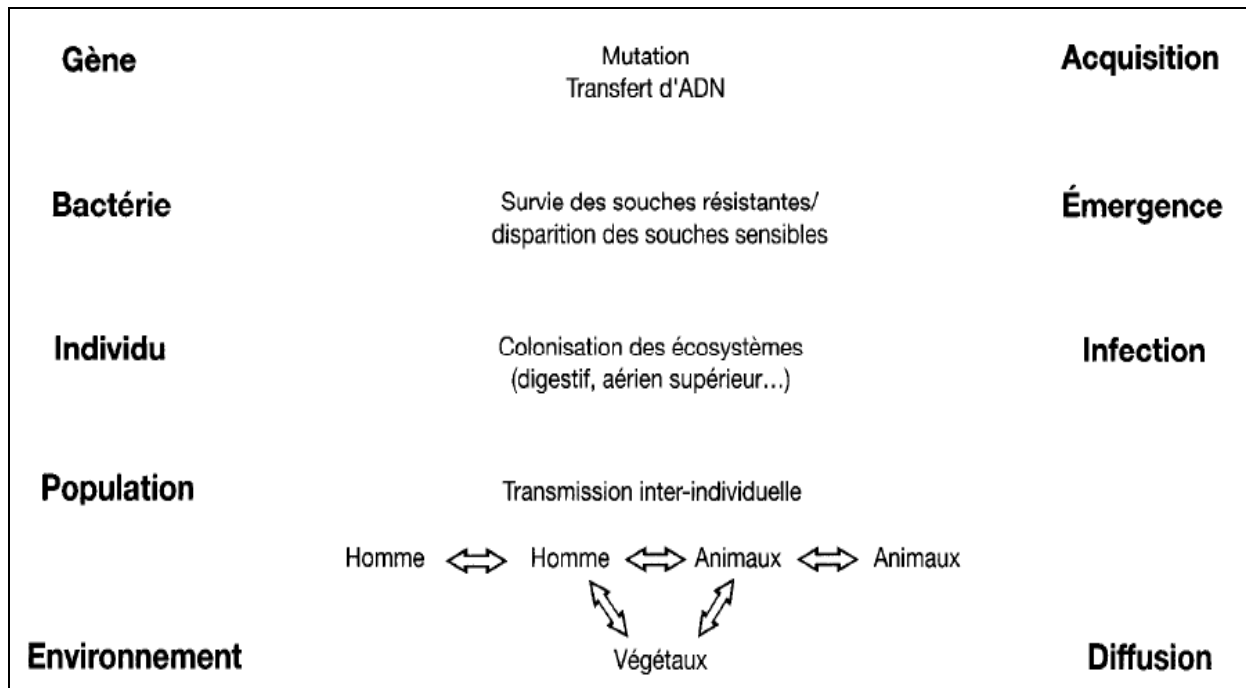
## **1. Origine de la résistance bactérienne aux antibiotiques :**

La résistance aux antibactériens par l'intermédiaire de gènes ainsi que de différents mécanismes spécifiques, représente le résultat de l'évolution des bactéries qui expriment à la perfection le principe biologique de Darwin «survie du plus apte». Ce phénomène a été, par conséquent, présent dans la nature depuis des milliers d'années, bien avant l'introduction des agents antibactériens commerciaux (**Smith, 1967**) (Figure 5). En fait, **Dancer et al., (1979)** ont isolé des bactéries résistantes, qu'ils ont estimé vieilles de plus de 2000 ans, au niveau des profondeurs d'un glaciers dans les régions arctiques élevée du Canada.

La résistance bactérienne aux antibiotiques est susceptible d'avoir eu son origine lorsque les organismes, à l'origine sensibles, réussissent à acquérir une protection de l'attaque concurrentielle d'autres organismes produisant des antibiotiques. Par conséquent, ces organismes ont pu aussi obtenir une protection contre leurs propres produits toxiques (**Smith, 1967 ; Phillips et al., 2004**). Cette supposition a été confirmée par la découverte d'enzymes modifiant l'aminoglycoside dans des organismes producteurs de ce dernier et qui affichent une forte homologie aux enzymes modificateurs trouvés chez des bactéries résistantes à la famille des aminoglycosides (**Davies, 1997**).

Il est donc impératif de reconnaître que la réponse à l'évolution bactérienne n'a pas été limitée à l'acquisition de gènes de résistance. Les bactéries ont également développées des moyens pour stabiliser le phénotype de résistance, anéantissant ainsi les espoirs d'inversion de la résistance en réduisant simplement l'usage des antibactériens (**Barbosa et Levy, 2000**).

La résistance bactérienne aux antibiotiques est apparue rapidement après leur introduction dans le traitement des maladies infectieuses (Tableau 1). Cette résistance est un facteur majeur compliquant la chimiothérapie antibactérienne, le contrôle des maladies infectieuses et la dissémination de souches multirésistantes (**Mainardi et al., 1996**).



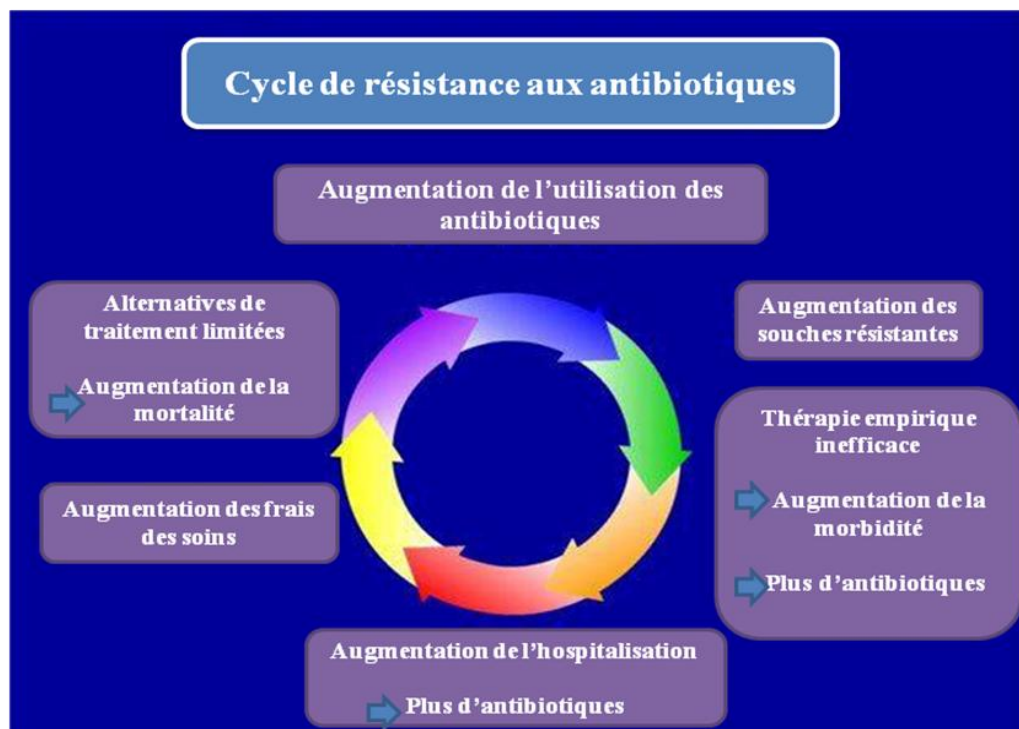
**Figure 5 :** Origine et dissémination de la résistance bactérienne aux antibiotiques (Henriet et Guillemot, 2000).

**Tableau 1:** Evolution de la résistance bactérienne aux agents antibactériens majeurs (Palumbi, 2001).

Agents antibactériens	Année de découverte	Année d'observation de la résistance
Sulfamides	1930	1940
Penicilline	1943	1946
Streptomycine	1943	1959
Chloramphénicol	1947	1959
Tétracycline	1948	1953
Erythromycine	1952	1988
Vancomycine	1956	1988
Méticilline	1960	1961
Ampicilline	1961	1973
Céphalosporine	1960	1960

Il ya plusieurs raisons pour lesquelles la résistance bactérienne devrait être d'une grande préoccupation pour la communauté médicale (Figure 6). Tout d'abord, les bactéries résistantes, en particulier les staphylocoques, les entérocoques, *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas spp.* deviennent une menace croissante dans les établissements de soins, en plus, leur potentiel à employer des mécanismes de résistance multiples vis-à-vis des différents antibactériens, rendent le traitement inefficace (Adesiyun, 1992 ; Furuya, 2006).

A cause de cette résistance, il est difficile et plus coûteux de traiter les infections communes, provoquant des retards dans l'efficacité du traitement, ou pire encore, l'échec à fournir le traitement approprié, qui peut avoir des conséquences graves, en particulier chez les patients gravement malades (White, 2001).



**Figure 6 :** Cycle de l'apparition de la résistance aux antibiotiques (Web 2).

## 2. Modes d'action des antibiotiques :

### ❖ Définition :

Un antibiotique est une substance antimicrobienne d'origine biologique, c'est-à-dire produite par un microorganisme (champignon microscopique et bactérie), ou de synthèse chimique (les Sulfamides), et qui est capable d'inhiber la multiplication ou de détruire d'autres microorganismes. Il existe deux catégories d'antibiotiques :

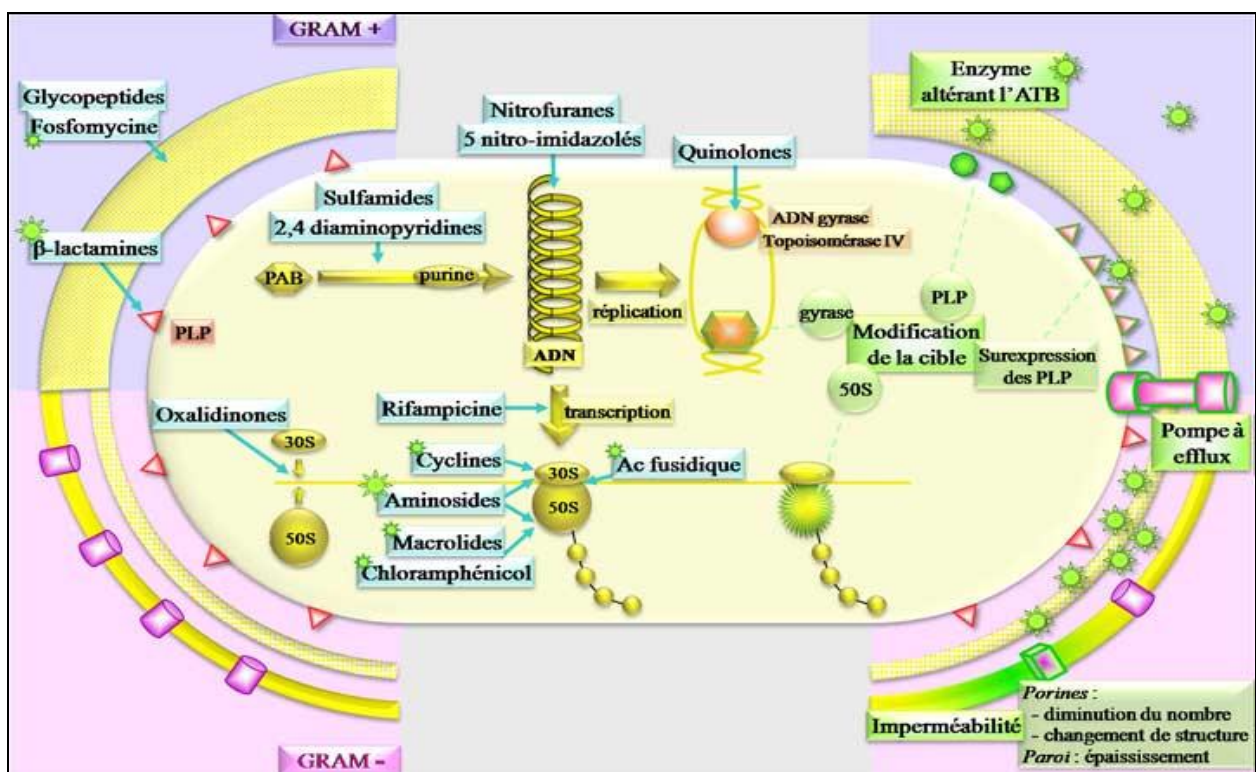
- Les antibiotiques à effet bactériostatique qui inhibent la croissance bactérienne en ralentissant puis arrêtant la multiplication et qui sont : les  $\beta$ -lactamines, les aminosides, les quinolones, les polypeptides, les rifamycines et les sulfamides-diaminopyridines.

- Les antibiotiques bactéricides qui lysent les bactéries et qui sont : les cyclines, les macrolides, les phénicolés, l'acide fusidique et les nitrofuranes (**Boulahbal, 2006**).

La connaissance de l'effet bactéricide ou bactériostatique d'un antibiotique est essentielle en antibiothérapie : la prescription d'un antibiotique bactéricide ou bactériostatique sera en fonction de la gravité de l'infection et de l'état du malade. Elle permet aussi de faire une association judicieuse d'antibiotiques (**Tenover, 2006**).

La plupart des agents antibactériens peuvent être classés en fonction de leur mécanisme d'action principal (Figure 7) :

1. Inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire.
2. Inhibition de la synthèse des protéines.
3. Interférence avec la synthèse d'acide nucléique.
4. Inhibition d'une voie métabolique.
5. Perturbation de la structure de la membrane phospholipidique bactérienne (**Carpenter et Chambers, 2004 ; Tenover, 2006**).



**Figure 7** : Les grandes familles d'antibiotiques ainsi que leurs modes d'action sur les bactéries à Gram positif et à Gram négatif (**Web 3**).



### **3. Les types de résistances aux antibiotiques :**

La résistance bactérienne aux antibiotiques se caractérise par son caractère naturel ou acquis, et par son mécanisme et son support génétique. En dépit de leur différence, les bactéries possèdent un nombre limité de mécanismes de résistance. Cependant, de nouveaux mécanismes ainsi que l'adaptation de mécanismes plus « anciens » apparaissent en réponse à l'utilisation de nouvelles molécules (Mainardi et al., 2005).

#### **3.1. Résistance naturelle ou intrinsèque :**

La résistance intrinsèque ou l'insensibilité aux antibiotiques, peut être décrite comme un phénomène naturel, caractéristique propre appartenant à l'ensemble des souches d'une espèce bactérienne et est en fonction de la composition biochimique ou physiologique de cette espèce. Elle fait, donc, partie du patrimoine génétique normal du germe (Yala et al., 2001).

Ce type de résistance peut résulter suite à une mutation des gènes de la régulation ou des gènes structurels (évolution verticale), à l'acquisition de gènes de résistance étrangers (évolution horizontale), ou à une combinaison de ces deux mécanismes. Cette mutation pourrait ne pas être présente chez l'espèce entière mais seulement chez certaines lignées de bactéries dérivées provenant d'un seul parent sensible (McManus, 1997 ; Harbottle et al., 2006).

La résistance naturelle a pour support génétique le chromosome bactérien et elle permet de définir le spectre d'activité des antibiotiques. Plusieurs mécanismes ont été mis en évidence (Philippon et Arlet, 2012). A titre d'exemple on cite :

- Les bacilles à Gram négatif (et notamment les entérobactéries et *Pseudomonas aeruginosa*) qui sont naturellement résistants, le plus souvent à bas niveau, aux antibiotiques hydrophobes et/ou de masse moléculaire élevée (pénicilline G, pénicilline M, macrolides, rifampicine, acide fusidique, novobiocine, vancomycine) car ces antibiotiques ne peuvent pas traverser la membrane externe de la paroi.
- Les systèmes d'efflux constitutifs ont été identifiés chez de nombreuses bactéries à Gram négatif. Ces mécanismes d'efflux actifs ont été décrits à l'origine chez *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*. Ils s'exercent vis-à-vis de nombreux antibiotiques dont la cible d'action est intracellulaire (quinolones, chloramphénicol, macrolides, tétracyclines...) et ils sont qualifiés de pompes d'efflux multi-drogues.

- Les PLP (protéines liant les pénicillines) des entérocoques qui ont une faible affinité pour les pénicillines M et les céphalosporines et les PLP des entérobactéries ayant une faible affinité pour la céfsulodine.
- Certaines espèces (*Pseudomonas aeruginosa*, ...) produisant naturellement des  $\beta$ -lactamases (**Philippon et Arlet, 2012**).

### **3.2. Résistance acquise :**

Malgré l'abondance des phénotypes de résistances observés chez les bactéries, il y a un nombre limité de mécanismes par lesquels ces caractères de résistance sont acquis. Les gènes codant pour des déterminants de bactéries résistantes aux antibiotiques peuvent être situés sur le chromosome, hérité par les cellules filles, et peuvent être transmis horizontalement sur les ADN mobiles tels que les plasmides et les transposons (**Bass et al., 1999**) ; autrement dit, c'est l'acquisition de nouveaux gènes capables de rendre la bactérie insensible à un antibiotique ou à un groupe d'antibiotiques (**Yala et al., 2001**).

Ce phénomène a atteint une telle ampleur que la seule identification bactérienne ne permet plus de prédire le comportement d'une souche isolée vis-à-vis des antibiotiques (**Yala et al., 2001**).

#### **3.2.1. Mécanismes génétiques de la résistance acquise :**

Le potentiel génétique d'une bactérie est constitué d'une part d'un génophore obligatoire, le chromosome, et d'autre part d'un ou de plusieurs génophores facultatifs et extra-chromosomiques, les plasmides. Des gènes sont également portés par des éléments génétiques transposables et par des intégrons. Une bactérie peut ainsi acquérir une résistance aux antibiotiques par deux grands mécanismes génétiques. L'un a pour support le chromosome et définit une résistance chromosomique, l'autre a pour support les plasmides ou les éléments transposables ou les intégrons et ils définissent une résistance extra-chromosomique (**Hardy, 2002**).

##### ***a. Résistance chromosomique :***

La résistance chromosomique résulte d'une mutation présentant tous les caractères suivants (**Hugues et Anderson, 2001**):

##### **\*Rareté :**

La mutation est un phénomène rare qui n'affecte qu'une faible fraction de l'ensemble des cellules bactériennes au sein d'une large population.

**\*Hasard :**

L'antibiotique ne provoque pas la mutation qui se produit au hasard. Il se contente de révéler et de sélectionner les bactéries mutantes.

**\*Spécificité :**

La mutation n'affecte habituellement qu'un seul caractère en respectant les autres. Dans certains cas, lorsqu'elle résulte de la modification d'une séquence de gènes fonctionnant ensemble (un opéron), elle peut affecter plusieurs caractères (mutation, pléiotropie).

**\*Indépendance :**

La mutation d'un caractère donné ne modifie pas la probabilité de mutation d'un autre caractère. Il y a indépendance des mutations.

**\*Transmissibilité :**

le caractère acquis est alors transmissible à la descendance, donc héréditaire. Elle est permanente (sauf mutation reverse).

***b. Résistance extra-chromosomique : Plasmidique :***

Les plasmides sont des segments d'ADN bicaténaires, circulaires et cytoplasmiques extra-chromosomiques, de petite taille, qui se répliquent de façon indépendante du chromosome et peuvent être échangés entre les différentes bactéries. La transmission d'un chromosome d'une cellule bactérienne à une autre peut s'effectuer par transformation, par conjugaison ou par transduction (Figure 8). Les plasmides ne sont pas essentiels pour la survie, mais portent généralement des gènes qui confèrent à la bactérie hôte un avantage sélectif, par exemple la virulence, l'adhésion et les déterminants des bactéries résistantes aux antibiotiques (**Frost et al., 2005 ; Harbottle et al., 2006**).

***c. Résistance extra-chromosomique : éléments génétiques transposables et intégrons***

**\* Les éléments génétiques transposables :**

Les transposons sont des séquences de gènes qui peuvent se déplacer d'un endroit à un autre au sein de l'ADN de la cellule bactérienne (chromosomique et plasmide). Les transposons sont responsables d'une proportion élevée des mutations et des réarrangements chromosomiques (**Biéumont, 2008**).

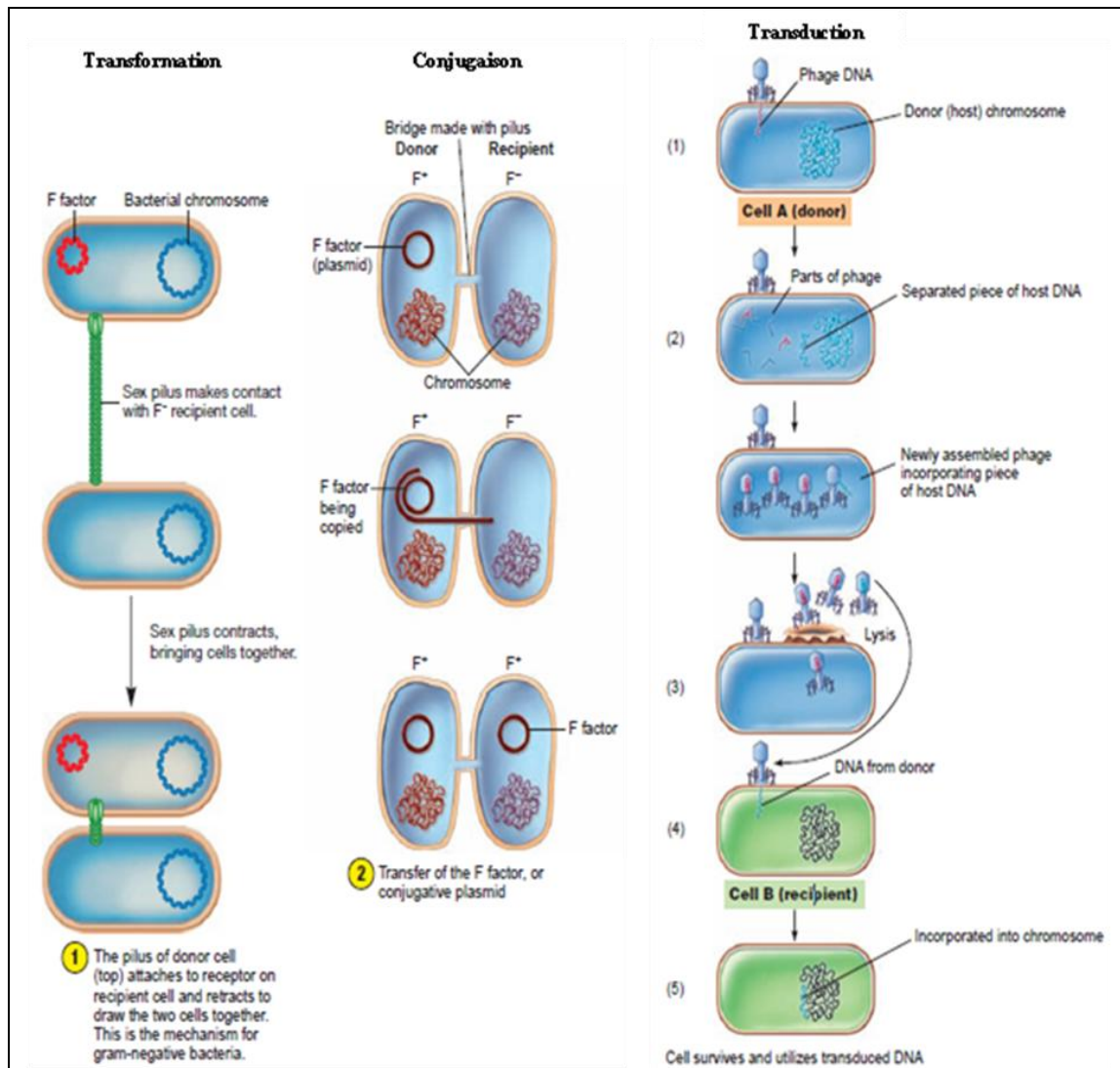
Les transposons furent mis en évidence grâce aux déterminants de résistance aux antibiotiques qu'ils véhiculent entre plasmides et chromosomes.

Un grand nombre de déterminants de résistance dans de nombreuses et différentes espèces bactériennes sont transmis par des transposons composites (Figure 9) (Salyers et Amabile-Cuevas, 1997 ; McDermott *et al.*, 2003 ).

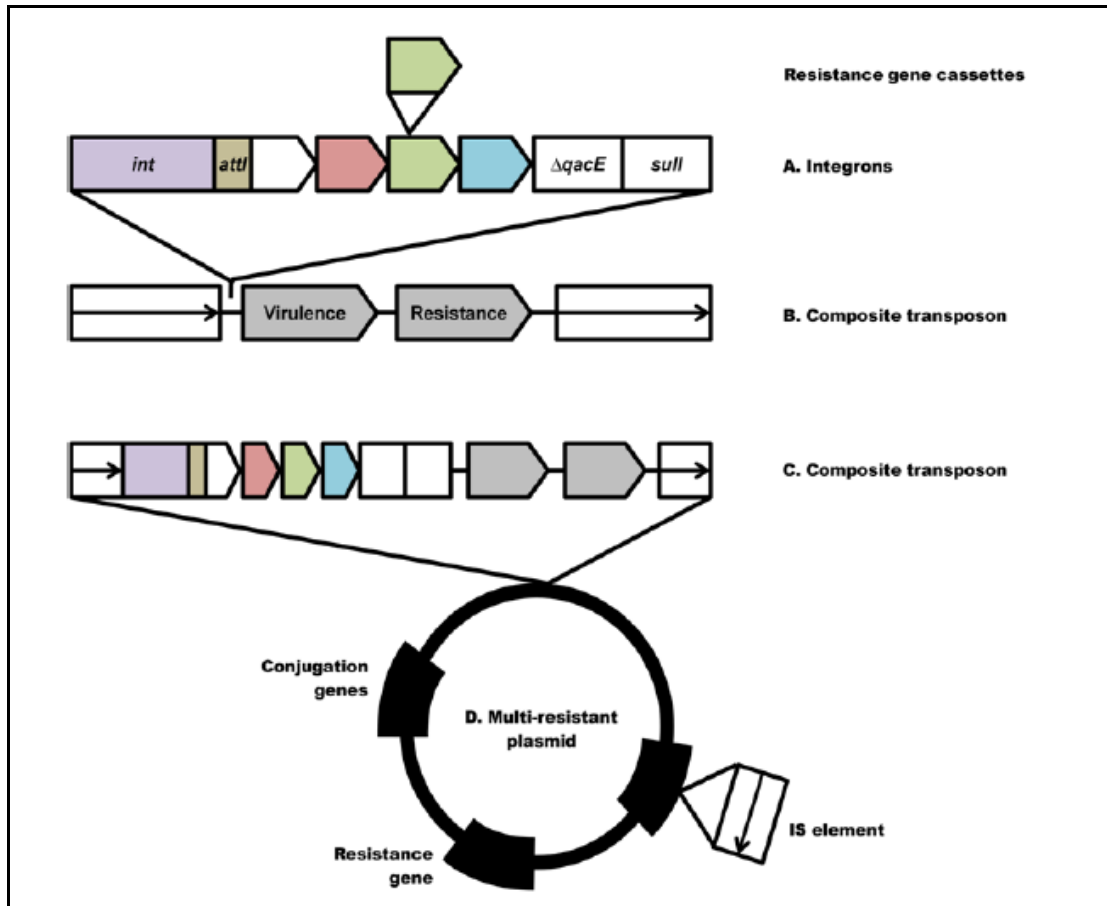
\* **Les intégrons :**

Les intégrons sont des systèmes de recombinaison spécifique de site permettant de réorganiser des gènes sous forme de cassettes mobilisables par l'action d'une intégrase (Hall *et al.*, 1999).

Depuis leur découverte dans les années 1980, ils se sont avérés les vecteurs d'expression naturels les plus complexes concernant la réorganisation des gènes de résistance aux antibiotiques (Figure 8). Les intégrons peuvent jouer un rôle dans l'évolution des bactéries en acquérant et exprimant rapidement de nouveaux gènes provenant d'autres bactéries (Stokes *et al.*, 1989 ; Hallet *et al.*, 1997).



**Figure 8 :** Mécanismes de la transformation, conjugaison et transduction (Park Talaro, 2008).



**Figure 9** : Résistance extra-chromosomique par éléments génétiques transposables et intégrons (McDermott, 2003).

### 3.2.2. Mécanismes biochimiques de la résistance acquise :

Les mécanismes biochimiques de la résistance acquise peuvent être regroupés en trois grands types:

#### *a. Diminution de la perméabilité et efflux actif :*

##### ➤ **Diminution de la perméabilité :**

Une diminution de la perméabilité résulte souvent d'une mutation affectant la structure des porines ou diminuant la synthèse des porines (Bonnet, 2004).

##### ➤ **Efflux actif :**

Des mutations dans les régions régulatrices des opérons des systèmes d'efflux multi-drogues peuvent conduire à une surexpression des systèmes d'efflux constitutifs, associée ou non à une perte des porines, et conférer une multirésistance aux antibiotiques (Bissonnette et al., 1991 ; Poole, 2000).

***b. Modification de la cible des antibiotiques :***

Elle résulte d'une seule mutation sur le site de fixation de l'antibiotique, ce qui conduit à la diminution de l'affinité du  $\beta$ -lactame vis-à-vis des PLP. Une augmentation ou l'induction de nouvelles PLP de faible affinité pour l'antibiotique conduit à la résistance (**Fauchère et Avril, 2002**).

***c. Synthèse d'enzymes inactivant les antibiotiques :***

Certaines bactéries ont la capacité de produire des enzymes en modifiant ou en clivant la molécule d'antibiotique, entraînant l'inactivation. Ce mécanisme est actuellement connu pour les  $\beta$ -lactamines, les Aminosides, le Chloramphénicol, les Streptogramines. Il est très largement répandu parmi les souches isolées en clinique (**Cavallo et al., 2004**).

*Chapitre 3 :*  
***BACTERIES TESTEES***

Les infections bactériennes sont responsables de maladies allant de l'angine bénigne aux épidémies de choléra et de peste. Les bactéries sont des micro-organismes remarquablement adaptables, à l'origine de maladies graves ou de simple colonisation de la peau. Elles sont capables de survivre et de se multiplier dans l'environnement ; certaines forment des spores qui survivent pendant des décennies. Un grand nombre parasite les animaux, et n'infecte l'homme que par hasard. D'autres ne peuvent survivre qu'au contact intime de leur hôte humain.

Alors que la plupart des bactéries se répliquent en quelques heures ou jours, d'autres ont une croissance beaucoup plus lente, entraînant des infections chroniques difficiles à traiter. En plus d'une grande diversité d'habitat, les bactéries ont un important potentiel d'adaptation génétique. Elles contiennent souvent de l'ADN plasmidique, capable de transférer du matériel génétique au sein de l'espèce ou vers des espèces différentes. Cette adaptabilité génétique peut accroître, à la fois, leur pouvoir pathogène et leur résistance aux antibiotiques (**Hart et Shears, 1997**).

## **1. Les bactéries à Gram positif :**

### **1.1. *Staphylococcus aureus* :**

#### **a. Habitat :**

Les Staphylocoques ont été découverts dans un pus par Pasteur en 1880. Ce sont des cocci à Gram positif, isolés ou groupés en diplocoques ou en amas, ayant la forme de grappe de raisin, immobiles, non sporulés mais parfois encapsulés (**Nauciel et Vildé, 2005**).

Il s'agit de germes très répandus dans la nature (air, eau, sol). Les staphylocoques font partie de la flore normale de nombreux individus qui sont des porteurs « asymptomatiques ». Cependant, ces souches peuvent être à l'origine d'auto-infections ou contaminer d'autres individus. Ils peuvent être trouvés à l'état saprophyte chez l'homme et l'animal au niveau des muqueuses particulièrement dans les fosses nasales antérieures (*S. aureus* : 30-40%). La transmission est surtout interhumaine directe (contact) ou indirecte par l'intermédiaire des aliments ou du milieu extérieur (**Park Talaro, 2008**).

#### **b. Pouvoir pathogène :**

Les infections à *S. aureus* sont très fréquentes et apparaissent sous des aspects cliniques très variés. *S. aureus* peut être à l'origine d'infections cutanées superficielles ou profondes.

L'infection superficielle se traduit par un impétigo, un onyxis ou une folliculite.

L'infection profonde est représentée par des abcès intra-folliculaires de toute la gaine du poil appelés furoncles. Ces récurrences sont parfois liées à des facteurs déclenchant : diabète, surmenage, etc ... (**Elazhari et al., 2009**).



Il existe plusieurs formes d'infections à Staphylocoque à savoir les *staphylococcies* pleuropulmonaires chez le nourrisson, les *staphylococcies* urogénitales, les *staphylococcies* neuroméningées, l'endocardite *staphylococcique*, les infections ORL à savoir les Sinusites, les otites, les abcès et amygdales (Wilson M., 2008).

Les septicémies à *S. aureus*, ou encore les staphylococcémies sont causées et entretenues par un foyer infectieux primaire compliqué de thrombophlébite ; ce sont des infections fréquentes, d'une gravité préoccupante (Elazhari et al., 2009).

Les toxi-infections alimentaires sont dues à l'ingestion d'entérotoxines (A et E), préformées dans l'aliment ce qui entraîne des troubles d'apparition précoce (moins de 3 heures) avec vomissements, diarrhée, déshydratation et absence de fièvre. L'évolution est bénigne, sauf en cas de pertes hydro-électrolytiques importantes (sujets âgés, nourrissons) (Wilson M., 2008).

## **1.2. *Enterococcus faecalis* :**

### **a. *Habitat* :**

Les entérocoques font partie de la flore intestinale commensale du tractus gastro-intestinal de l'homme et des animaux. Ils ont été longtemps reconnus comme pathogènes humains importants. *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium* sont les espèces les plus répandues en culture de l'homme, ce qui représente plus de 90% des isolats cliniques.

Depuis le début de l'ère des antibiotiques, ils ont posé des défis thérapeutiques majeurs, d'où la nécessité d'une combinaison synergique des antibiotiques pour traiter avec succès l'endocardite infectieuse à entérocoques (de Perio et al., 2006 ; Klibi et al., 2007).

### **b. *Pouvoir pathogène* :**

Les Infections à entérocoques peuvent être parmi les problèmes les plus difficiles rencontrés dans la pratique clinique des maladies infectieuses. *Enterococcus* est le troisième pathogène le plus couramment rencontré entraînant une endocardite infectieuse de la valve, après les *streptococcus* et *Staphylococcus aureus* (Wax et al., 2008 ; Strickertsson et al., 2013).

*Enterococcus faecalis* peut causer des infections post-chirurgicales de la paroi abdominale, la méningite, les infections des voies urinaires, bactériémie, et l'endocardite (inflammation de la paroi interne du cœur) (Frainmow et al., 1994). Il a été, de plus en plus, isolé dans un grand nombre de cas de lésions cancéreuses orales et dans les cancers du côlon humain (Strickertsson et al., 2013).

## **2. Les bactéries à Gram négatif (*Enterobacteriaceae*) :**

La famille des *Enterobacteriaceae* est constituée de genres bactériens qui sont rassemblés en raison de leurs caractères bactériologiques communs (Avril et al., 2000 ; Freney, 2006).

- Ce sont des bacilles à Gram négatif dont les dimensions varient de 1 à 6 µm de long et 0,3 à 1 µm de large.
- Mobiles par une ciliature péritriche ou immobiles.
- Se développant en aéro-anaérobiose et sur gélose nutritive ordinaire.
- Acidifiant le glucose par voie fermentative (à la différence des *Pseudomonas*) avec souvent production de gaz.
- Ne possédant pas d'oxydase (à la différence des *Vibrio* et *Pasteurella*).
- Réduisant les nitrates en nitrites.
- Les *Enterobacteriaceae* ont un GC % compris entre 38 et 60 mol %.

Les bactéries appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* sont celles qui sont le plus souvent rencontrées en clinique. Elles forment un vaste groupe de bacilles à Gram négatif, aérobies-anaérobies facultatifs, non sporulés qui sont très largement distribués dans la nature et peuvent faire partie de la flore normale du tube digestif de l'homme et des animaux. Dans ce groupe de bactéries entériques figurent des bactéries pathogènes strictes comme *Salmonella* et *Shigella*, d'autres considérées comme opportunistes ou pathogènes occasionnels comme *Proteus* et *Klebsiella* et enfin des bactéries essentiellement saprophytes du tube digestif et qui dans certaines circonstances peuvent être responsables d'infections comme *Escherichia*. Plus de 30 genres et plus de 130 espèces d'*Enterobacteriaceae* ont été décrits. Leur identification est basée surtout sur des tests culturels, des caractères biochimiques et antigéniques (Avril et al., 2000 ; Nauciel et Vildé, 2005).

### **2.1. *Escherichia coli* :**

#### **a. *Habitat* :**

Isolée pour la première fois par Escherich en 1885, *Escherichia coli* est l'espèce bactérienne qui a été la plus étudiée par les fundamentalistes pour des travaux de physiologie et de génétique. Cette bactérie est connue depuis longtemps comme commensale du tube digestif et pathogène pour l'appareil urinaire (Avril et al., 2000 ; Nauciel et Vildé, 2005).

Elle fait partie de la flore microbienne de la partie terminale du tube digestif de l'homme et des animaux à sang chaud (Freney et al., 2006). Dans l'intestin, *E. coli* est l'espèce aérobie quantitativement la plus importante, présente à raison de  $10^7$  à  $10^9$  corps bactériens par gramme

de selles. La contamination se fait par voie oro-fécale. La transmission se fait souvent *via* la viande contaminée et mangée crue ou pas assez cuite. La consommation de fruits et légumes lavés avec de l'eau contaminée, de lait cru, ou une baignade dans une eau souillée par exemple, peuvent aussi être à l'origine de ces infections (Savageau, 1983).

***b. Pouvoir pathogène :***

*E. coli* est un agent pathogène polyvalent et dévastateur impliqué dans une large gamme de pathologies intestinales et extra-intestinales.

Les infections intestinales sont causées par plusieurs pathovars :

- *E. coli* entérovirulente et *E. coli* entéro-pathogène se manifestent par une diarrhée.
- *E. coli* entéro-toxinogène qui est responsable de diarrhées très liquides.
- *E. coli* entéro-invasif qui est isolée de syndromes dysentériques tant chez l'adulte que chez l'enfant.
- *E. coli* entéro-hémorragique responsable d'épidémies de diarrhées aqueuses puis hémorragique (colite hémorragique).
- *E. coli* entéro-agrégatif qui peut être responsable de diarrhée persistante.

La majorité des infections urinaires de la femme jeune observées en pratique médicale est due à *E. coli*. Les souches provenant de la flore fécale contaminent les urines par voie ascendante. C'est la classique « colibacillose ». On trouve également les méningites néo-natales dont un tiers d'entre elles est due à *E. coli*. Cette bactérie est responsable de septicémie et de plusieurs infections génitales (Kosek et al., 2003 ; Russo et Johnson, 2003).

***2.2. Klebsiella pneumoniae et Klebsiella oxytoca :***

***a. Habitat :***

*K. pneumoniae* et *K. oxytoca* sont les espèces les plus souvent rencontrées dans la nature et chez l'homme. Elles sont fréquemment isolées des eaux, du sol et des végétaux. Elles sont présentes dans la flore fécale de l'homme et sont souvent commensales de la peau, des muqueuses et des voies respiratoires.. Ils peuvent également coloniser les plaies et l'urine.

Les malades s'infectent soit avec leurs propres souches, soit avec des souches responsables de petites épidémies hospitalières. Elles sont alors manuportées de malade à malade (Avril et al., 2000).

***b. Pouvoir pathogène :***

*K. pneumoniae* est de loin la plus rencontrée ainsi que *K. oxytoca*. Elles sont isolées principalement de broncho-pneumopathies aiguës ou subaiguës où elles provoquent des

changements destructeurs à savoir la nécrose, l'inflammation, l'hémorragie, les expectorations mucoïdes épaisses, elles sont responsables des infections urinaires, hépato-biliaires et de pus divers. En raison du terrain débilisé sur lequel elles se développent, les septicémies à *Klebsiella* ont un pronostic très sévère (Mandell et al., 2009 ; Nordmann et al., 2009).

En milieu hospitalier où elles sont très souvent rencontrées, elles sont considérées comme des bactéries «pathogènes opportunistes» et présentent souvent une multirésistance aux antibiotiques (Nordmann et al., 2009)

### **2.3. *Enterobacter cloacae* et *Enterobacter aerogenes* :**

#### **a. *Habitat* :**

Les *Enterobacter* font partie de la flore normale du tractus gastro-intestinal de l'homme et des animaux. Ils sont largement présents dans l'environnement : on les trouve dans les eaux, sur le sol, sur la peau et les muqueuses.

Les *Enterobacter* sont des bactéries opportunistes capables de causer des infections chez les patients hospitalisés ou affaiblis (Keller et al., 1998 ; Avril et al., 2000 ).

#### **b. *Pouvoir pathogène* :**

Les infections à *Enterobacter* peuvent inclure les bactériémies, les infections des voies respiratoires inférieures, les infections cutanées et des tissus mous, les infections des voies urinaires, l'endocardite, l'arthrite septique, l'ostéomyélite, les infections du système nerveux central, et des infections ophtalmiques. Les infections à *Enterobacter* peuvent nécessiter une hospitalisation prolongée avec multiples études d'imagerie et de tests de laboratoire, diverses interventions chirurgicales et non chirurgicales, et l'utilisation d'agents antimicrobiens puissants et coûteux (Rossi et al., 2006 ; Lockhart et al., 2007).

### **2.4. *Proteus mirabilis* et *Proteus vulgaris* :**

#### **a. *Habitat* :**

Le genre *Proteus* fait partie des bactéries de la flore intestinale humaine normale, avec *E. coli* et les *Klebsiella*. *Proteus* est également rencontré partout dans l'environnement : sur le sol, dans les eaux de surface, dans les eaux d'égout, en milieu hospitalier, où il colonise à la fois la peau et la muqueuse buccale des patients et du personnel hospitalier. L'infection se produit principalement à partir de ces réservoirs. Cependant, les espèces *Proteus* ne sont pas la cause la plus fréquente des infections nosocomiales (Nauciel et Vildé, 2005 ; Frenod, 2006).

**b. Pouvoir pathogène :**

*Proteus mirabilis* est responsable de 90% des infections acquise dans la communauté.

Ces bactéries sont avant tout responsables d'infections urinaires. *P. mirabilis* est de loin l'espèce la plus fréquente. Une anomalie de l'appareil urinaire ou un diabète sont des circonstances favorisant la survenue de ces infections qui peuvent être à l'origine de septicémies.

Ces bactéries sont aussi isolées de produits pathologiques variés : sécrétions trachéo-bronchiques, brûlures, pus divers. Des méningites à *Proteus* ont été décrites chez le nourrisson.

Le pouvoir entéropathogène des *Proteus* est très discutable. Ces espèces sont souvent présentes en grande quantité dans les selles lors des diarrhées par dysmicrobisme intestinal (Avril et al., 2000 ; Frenod, 2006).

**2.5. *Serratia marcescens*, *Serratia fonticola* et *Serratia odorifera* :**

**a. Habitat :**

Les *Serratia* sont des bactéries de l'environnement, trouvées sur le sol et sur les plantes. *S. marcescens* est une espèce ubiquitaire qui est la seule à jouer un rôle important comme pathogène opportuniste. Les souches pigmentées sont répandues dans la nature, mais rarement isolées en milieu hospitalier ; les souches non pigmentées sont fréquemment isolées en milieu hospitalier. Elles sont beaucoup plus résistantes aux antibiotiques.

Les *Serratia* sont les Entérobactéries les plus résistantes aux agents physiques et chimiques (Araj et al., 1994 ; Avril et al., 2000).

**b. Pouvoir pathogène :**

Les *Serratia* sont peu pathogènes pour les sujets sains. Aujourd'hui, elles sont responsables d'infections hospitalières parfois épidémiques, particulièrement *S. marcescens*.

*S. marcescens* est l'espèce la plus couramment isolé dans les infections humaines. Elle est reconnue comme étant un important agent pathogène humain. *S. marcescens* a été récupéré à partir d'une grande variété de spécimens cliniques. Elle cause des maladies du système nerveux central telles que la méningite, les infections des voies urinaires, la pneumonie et d'autres maladies respiratoires, les septicémies (*S. marcescens* se classe parmi les 10 genres les plus fréquemment isolés), l'endocardite, et de nombreux types de plaies (Mahlen, 2011).

La localisation de l'infection dépend de la nature de l'activité du service hospitalier et de l'appareillage utilisé. *S. fonticola* a été isolée à partir d'un abcès purulent cutané, elle cause également des sépticémie, des diarrhées et d'autres prélèvements. *S. odorifera* est souvent isolée lors des infections urinaires ou septicémies (Mahlen, 2011).

En dehors des infections acquises à l'hôpital, des infections graves à *Serratia* (endocardites, ostéomyélites) ont été observées chez les héroïnomanes (Avril et al., 2000).

## **2.6. *Salmonella* sp. :**

### **a. Habitat :**

Le genre *Salmonella* englobe un vaste éventail de bactéries qui causent un large spectre de maladies chez l'hôte. Elles sont transmises par la voie fécale-orale, donc par les aliments et l'eau souillés, par des selles de malades ou de convalescents (porteurs sains), ou là où les conditions sanitaires sont insuffisantes (les eaux d'égout en particulier) et l'accès à l'eau potable est limité. Des *Salmonella* sont aussi fréquemment retrouvées dans les farines de poisson ou poudres d'os utilisées pour l'alimentation des animaux. Elles sont avant tout des parasites du tube digestif de l'homme et des animaux. Les sérotypes qui, contrairement aux précédents n'ont pas de spécificité d'hôte, sont dits ubiquitaires (Parry, 2006).

### **b. Pouvoir pathogène :**

L'homme est le seul hôte naturel et le réservoir d'infection à *S. enterica* sérotype Typhi . La dose infectieuse chez des porteurs varie entre  $10^3$ - $10^9$  organismes. *S. enterica* sérovar Typhi doit survivre à la barrière d'acide gastrique, en route vers les intestins (House et al., 2001 ;Bhan et al., 2002).

Les salmonelles sont capables de survivre et de se multiplier dans les cellules phagocytaires mononucléées des follicules lymphoïdes. La bactériémie due à la fièvre typhoïde persiste pendant plusieurs semaines si le traitement antibiotique n'est pas administré. Dans cette phase, le micro-organisme diffuse largement au niveau du foie, la rate, la moelle osseuse, la vésicule biliaire et les plaques de Peyer de la borne de l'iléon (Everest et al., 2001).

- Les toxi-infections alimentaires à *Salmonella* se manifestent par des diarrhées, de la fièvre, et des vomissements. L'évolution de ces gastro-entérites est en règle générale spontanément favorable en quelques jours.

- Les entérites à *Salmonella* s'observent principalement chez le jeune enfant. Des épidémies peuvent survenir dans des collectivités de nourrissons.

- La typhoïde est une forme septicémique qui se manifeste par une infection aiguë généralisée du système réticuloendothélial, du tissu lymphoïde intestinal et de la vésicule biliaire due à *Salmonella Typhi*. Cette maladie transmissible est strictement humaine et les porteurs sains jouent le rôle de réservoir de cette bactérie. Les formes sévères sont caractérisées par une fièvre élevée, des douleurs abdominales, malaises et maux de tête.

- Les fièvres paratyphoïdes sont également des fièvres entériques comme la typhoïde et sont dues à *Salmonella paratyphi* A, B et C. Les fièvres paratyphoïdes représentent environ 10 % des fièvres contre 90 % pour la typhoïde due à *Salmonella Typhi* (Freney et al., 2006).

Il existe également des formes de salmonelloses extra-digestives qui sont plus rares : infections urinaires, cholécystites, méningites, ostéomyélites, spondylodiscites, infections pulmonaires. Ces formes surviennent plus volontiers chez des malades immunodéprimés (Parry, 2006).

## **2.7. *Citrobacter freundii* :**

### **a. Habitat :**

Les *Citrobacter* sont des bactéries commensales du tube digestif de l'homme et des animaux à sang chaud. Ils sont trouvés dans l'environnement et dans les eaux. Ils peuvent être isolés occasionnellement d'urines ou de suppurations diverses (Avril et al., 2000 ; Freney et al., 2006).

### **b. Pouvoir pathogène :**

Comme un pathogène opportuniste, *Citrobacter freundii* est souvent la cause des infections opportunistes importantes, ce qui signifie qu'il ne cause généralement pas de maladie chez les hôtes humains sains. Il n'affecte que les patients avec un système immunitaire faible. Par conséquent, l'infection par l'espèce *Citrobacter* chez les patients ayant un système immunitaire affaibli, provoque une grande variété d'infections nosocomiales des voies respiratoires, des voies urinaires, et du sang (Whalen et al., 2007).

Des maladies hépatiques, biliaires et pancréatiques sont aussi des maladies communes causées par *Citrobacter freundii*. Les voies biliaires sont le site le plus fréquemment infecté par ce dernier (Marco et al., 1985).

Une maladie mortelle a été associée à *C. freundii* il s'agit de la méningite néonatale qui est une inflammation des méninges (le système de membranes qui entourent le SNC) en raison de l'invasion bactérienne causant des taux de mortalité allant de 25 à 50%. En outre, des problèmes neurologiques graves persistent dans 75% des survivants (Julie et al., 1985).

## **2.8. *Pseudomonas aeruginosa* :**

### **a. Habitat :**

C'est une bactérie ubiquiste qui vit normalement à l'état saprophyte dans l'eau et le sol humide ou sur les végétaux. Elle résiste mal à la dessiccation. Cette bactérie peut vivre en commensale dans le tube digestif de l'homme et de divers animaux. Le bacille pyocyanique peut survivre et

se multiplier dans une infinie variété de liquides et de milieux, de supports et de matériels, surtout s'ils sont humides. Considéré comme une bactérie pathogène opportuniste c'est le germe-type des infections hospitalières ou nosocomiales (**Nauciel et Vildé, 2005**).

***b. Pouvoir pathogène :***

Peu virulent pour l'individu normal, le bacille pyocyanique est par contre un agent infectieux redoutable lorsque les défenses immunitaires du sujet sont altérées. *P. aeruginosa* est l'exemple type de la bactérie pathogène opportuniste.

Les malades particulièrement sensibles sont les nourrissons, les personnes âgées, les sujets atteints d'infections graves, chroniques, métaboliques (diabète) mais surtout hématologiques ou cancéreuses. Les traitements immunosuppresseurs, les corticoïdes, les anti-métabolites favorisent l'infection à bacille pyocyanique d'origine endogène. Chez les brûlés, cette infection est l'une des causes majeures de mortalité.

*P. aeruginosa* est responsable d'infections pulmonaires qui peuvent être primitives ou secondaires à une septicémie. Les pneumopathies primitives s'observent exceptionnellement chez le sujet sain mais sont le lot courant des maladies trachéotomisés, des insuffisants respiratoires sous antibiothérapie prolongée, des malades atteints d'hémopathies ou de cancers et recevant une chimiothérapie, ainsi que chez les enfants atteints de mucoviscidose qui se complique souvent de surinfections bronchiques bactériennes notamment à *S. aureus* (**Avril et al., 2000**).

Il est responsable d'infections urinaire qui sont très fréquentes ; elles ne sont jamais primitives, mais toujours nosocomiales ou iatrogènes secondaires à une exploration des voies urinaires. En ce qui concerne les infections cutanées chez le sujet sain, on peut observer un onyxis, avec périonyxis réalisant l'ongle vert, des infections interdigitales et des surinfections d'ulcères de jambe. Chez les brûlés, la colonisation des lésions par le bacille pyocyanique est rapide.

*P. aeruginosa* est fréquemment rencontré dans les bactériémies nosocomiales (14%), représentant environ ¼ des bactériémies à Gram négatif (**Avril et al., 2000 ; Nauciel et Vildé, 2005**).

**2.9. *Acinetobacter baumannii* :**

***a. Habitat :***

*A. baumannii* est l'espèce la plus souvent isolée en milieu hospitalier. Bactérie ubiquitaire, elle se trouve principalement dans le sol et l'eau (les eaux d'égouts), isolée parfois dans le lait et les produits laitiers et dans les aliments. Elle est très fréquemment isolée chez l'homme : peau,



salive, urine, conjonctive. Elle figure parmi les bactéries de la flore résidente normale du revêtement cutané.

Les sources d'infections à *Acinetobacter* sont nombreuses en milieu hospitalier. Cette bactérie a la faculté de coloniser le matériel : respirateurs, humidificateurs, lavabos, savons et antiseptiques. Elle peut être véhiculée par les mains du personnel soignant et la majorité des infections sont acquises à l'hôpital. Le fait que les *Acinetobacter* soient fréquemment isolés de la peau des malades hospitalisés, mais aussi de sujets normaux, ne permet pas de dire avec certitude s'il s'agit de germes commensaux ou contaminants (**Avril et al., 2000**).

***b. Pouvoir pathogène :***

Les *Acinetobacter* sont parfois considérés uniquement comme des contaminants des prélèvements. Ils sont cependant dans un certain nombre de cas responsables de méningites graves, de septicémies, de pleurésies, de conjonctivites, de sinusites, de suppurations cutanées, d'infections urinaires, d'ulcérations intestinales et de péricardites.

Lorsque *Acinetobacter* est isolé dans les hémocultures, le foyer initial est souvent un cathéter suite à une intervention de chirurgie digestive. On peut observer une septicémie vraie dans le cas d'un malade fragilisé par une intervention chirurgicale majeure, un traumatisme ou un âge avancé. Dans le cas des infections urinaires, une cause mécanique est souvent retrouvée (adénome prostatique, grossesse, sondage).

Quand aux méningites, elles peuvent être secondaires à une manœuvre chirurgicale ou à un traumatisme. Le diagnostic différentiel rigoureux avec les *Neisseria* s'impose. Dans les cas authentiques de méningites à *Acinetobacter*, le pronostic est mauvais.

Les suppurations à *Acinetobacter* peuvent survenir notamment en chirurgie osseuse par surinfections de plaies provenant de la pose de prothèses (hanche), de broches, d'enclouages.

Dans les infections respiratoires *Acinetobacter* peut être isolé lors de pleurésies, de pneumonies, dans les crachats et aspirations de malades de réanimation (**Wilson M., 2008**).

*Chapitre 4 :*  
***LA CYTOTOXICITE***  
***ET LA GENOTOXICITE***

Afin d'évaluer le potentiel toxique d'un médicament ou d'une molécule nouvellement synthétisée (promédicament), plusieurs tests sont utilisés parmi lesquels, les tests d'évaluation de la cytotoxicité et de la génotoxicité.

## **1. La cytotoxicité :**

La toxicologie est une branche de la science qui a pour objectif l'étude des poisons, indiquant les effets indésirables causés par l'interaction entre les substances toxiques et les cellules (Syahmi *et al.*, 2010 ; Alam *et al.*, 2012). Elle vise à analyser l'origine des substances, leur effet physiologique, leur mécanisme d'action, les doses d'apparition de cette toxicité ainsi que les moyens pour lutter contre leurs actions nocives.

Le poison ou toxique est une substance qui produit une action nocive sur l'organisme vivant. Cette action toxique se manifeste par des troubles d'une ou de plusieurs fonctions vitales pouvant conduire à la destruction de celle-ci, voire au décès de l'individu. Ainsi, toute action qui restaure, corrige ou modifie le fonctionnement de l'organisme est potentiellement toxique envers ce dernier. Ce sont, en effet, la quantité et la voie d'administration qui font la toxicité du produit.

Un xénobiotique est une substance chimique exogène, qui n'existe pas dans un cycle prédestiné de l'organisme. Les médicaments sont des xénobiotiques et peuvent être toxiques. Leur étude suppose l'évaluation de leur toxicité (Claverie et Hedde, 2008).

C'est pourquoi toute demande d'obtention d'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) d'un nouveau produit, nécessite une étude approfondie de la toxicité du principe actif et de ses métabolites, ce qui permet de définir les doses usuelles, les doses maximales et les signes de surdosage (Claverie et Hedde, 2008).

Plusieurs facteurs confèrent une toxicité à un xénobiotique :

### **a) Facteurs dépendants du médicament :**

- La nature chimique du principe actif.
- La nature des excipients du médicament, ou on peut citer le lactose, l'aspartam, l'amidon de blé.
- Voie et vitesse d'administration.

### **b) Facteurs dépendant du patient:**

- Etat physiologique : l'âge, le sexe, le poids et la masse corporelle ; l'appartenance à un type ou un autre de métabolisme.
- Etat pathologique du patient.

- Environnement : pollution atmosphérique, pollution sur le lieu de travail, pollution domestique (Claverie et Hedde, 2008).

### **1.1. Le test d'évaluation de la cytotoxicité sur *Artemia salina* :**

L'évaluation de la cytotoxicité est le premier test qui peut apporter un aperçu fiable de la sécurité d'un produit destiné pour la consommation pharmaceutique, cosmétique, alimentaire etc ... Depuis l'interdiction de l'utilisation des animaux pour l'évaluation de la cytotoxicité d'un produit, des tests de cytotoxicité, *in vitro*, ont été mis au point comme méthode alternative à la manipulation sur les animaux (rongeurs, lapin, cochon,...). Ainsi, ces dernières années ont vu le développement d'un certain nombre de tests de toxicité dans lequel la réponse a été mesurée chez les invertébrés. Ces tests ont l'avantage d'être peu coûteux, reproductibles et faciles à réaliser (Favilla et al., 2006). Les invertébrés ont été utilisés dans des tests qui sont régis par certaines autorités réglementaires pour l'évaluation des risques environnementaux des pesticides, des produits chimiques et polluants (Commission of the European Communities (CEC), 1991; United States Environment Protection Agency (US EPA), 2002).

Beaucoup de chercheurs ont fait usage d'un crustacé aquatique, *Artemia salina* (*A. salina*), pour l'analyse de la toxicité de produits synthétiques et naturels (Caldwell et al., 2003 ; Alluri et al., 2006 ; Favilla et al., 2006 ; Manilal et al, 2009 ; Syahmi et al, 2010). L'évaluation de la toxicité est basée sur la mesure du pourcentage de létalité des nauplii d'*A. salina* à différentes concentrations du produit à tester. Ce test est couramment utilisés pour l'estimation de la cytotoxicité et fournit des données toxicologiques qui sont importantes pour évaluer la pertinence pharmacologique des produits naturels ou de synthèse (Hisem et al., 2011 ; Otang et al., 2013).

Le dosage de la cytotoxicité sur *A. Salina*, en mesurant la CL50 (concentration nécessaire pour provoquer 50% de létalité), a été considéré comme un outil important pour l'évaluation préliminaire de la toxicité (Syahmi et al., 2010). Cette méthode détecte des petites quantités de toxines et peut être réalisée à l'échelle de microcellules (Kamba et Hassan, 2010).

- **L'*Artemia salina* (la crevette de saumure) :**

*A. salina* est un arthropode aquatique primitif de la famille Artemiidae, âgé d'environ 100 millions d'années, et qui ne vit que dans les lacs et les étangs à forte salinité (jusqu'à 300 grammes de sel par litre d'eau) en présence du permanganate de potassium et du nitrate d'argent. En 1758 Linny l'a décrit comme *Cýncer salinus* ; 61 ans plus tard, Leach (1819) l'a renommé *Artemia salina* (Dumitrascu, 2011).

Cette espèce peut survivre dans l'eau avec une carence élevée en oxygène, et peut résister à de longues périodes de sécheresse sous forme de kystes pour reprendre le cycle de vie normal lorsque les conditions sont propices à son développement et à sa reproduction.

*A. salina*, en particulier le stade nauplii, est utilisé dans l'aquaculture comme nourriture vivante pour la croissance de nombreuses espèces de poissons et de crustacés.

La résistance de ce crustacé en a fait un modèle idéal pour les études d'écotoxicologie, ainsi que de toxicologie générale (**Dumitrascu, 2011**). *A. salina* est utilisé régulièrement dans les tests de toxicité de divers produits chimiques (**Cleuvers, 2003**) et de composés naturels (**Caldwell et al., 2003**).

L'évaluation de la cytotoxicité des composés bioactifs, tel que les médicaments, est réalisée sur les œufs et sur les larves d'*A. salina* (**Meyer et al., 1982 ; Ishfaq et al., 2013**).

## **2. la génotoxicité :**

La toxicologie génétique ou génotoxicologie est une discipline qui vise à détecter des facteurs chimiques ou physiques interagissant (directement ou non) avec l'ADN des cellules somatiques et/ou germinales et qui, en l'absence de réparation fidèle, sont susceptibles de provoquer des mutations géniques et/ou chromosomiques. Ces mutations sont susceptibles d'initier un processus cancérogène lorsqu'elles ont lieu sur des cellules somatiques. En cas d'atteinte des cellules germinales, l'effet génotoxique risque d'entraîner une toxicité vis-à-vis de la reproduction (reprotoxicité) et/ou un risque théorique de transmission des mutations à la descendance (Figure 10) (**Thybaud et al., 2007 ; Berthelot-Ricou et al., 2013**).

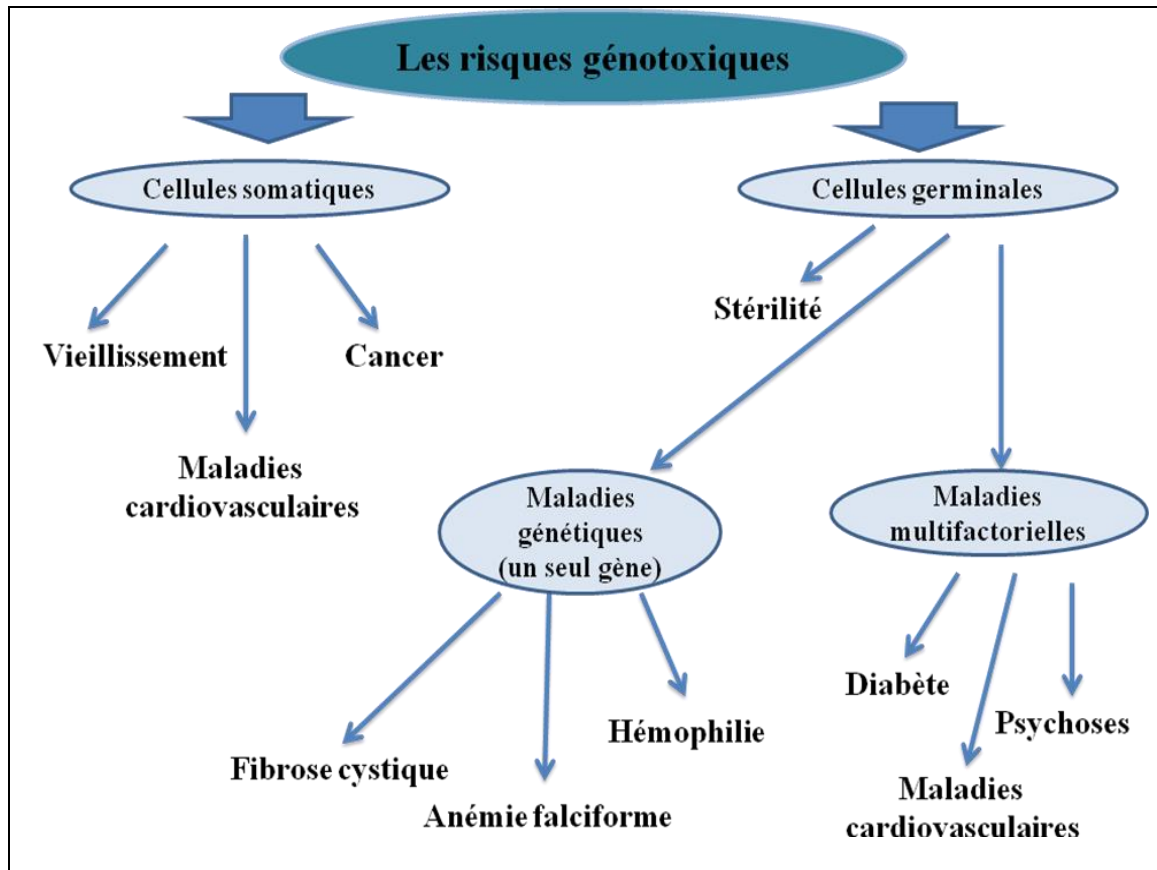


Figure 10 : Les différents risques génotoxiques.

Une mutation est décrite comme étant un changement spontané ou induit de l'ADN.

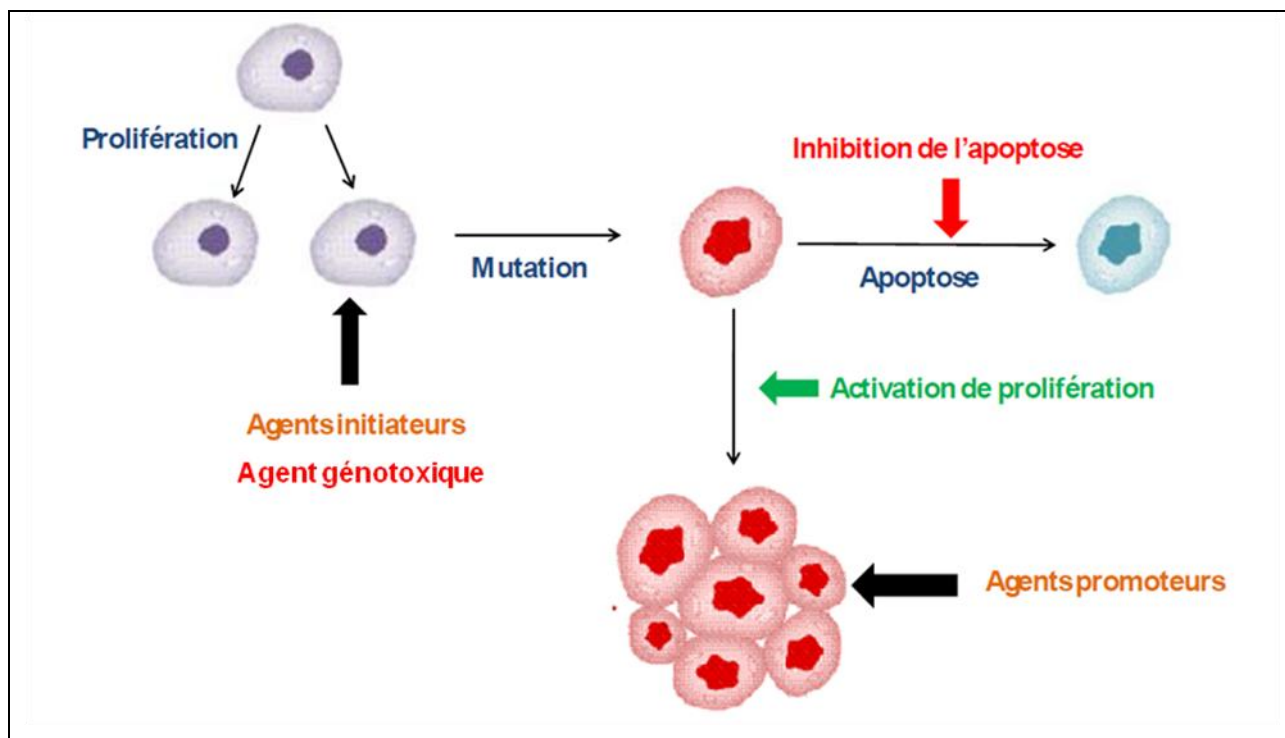
Une mutation spontanée est un changement aléatoire dans l'ADN résultant d'erreurs dans la réplication qui se produisent sans cause connue. La fréquence des mutations spontanées a été mesurée pour un certain nombre d'organismes. La fréquence rapide de reproduction bactérienne permet d'observer plus facilement ces mutations chez ces dernières que chez la plupart des eucaryotes.

Les mutations induites résultent de l'exposition aux agents mutagènes connus, qui sont principalement des agents physiques ou chimiques qui interagissent avec l'ADN. L'utilisation contrôlée de mutagènes a permis de mettre au point des souches microbiennes mutantes destinées à des études de génotoxicité (Park Talaro, 2008).

L'exposition d'une cellule à un agent mutagène augmente le nombre d'erreurs. On peut donc définir un agent mutagène comme un agent physique ou chimique capable de provoquer des mutations à une fréquence supérieure à celle des mutations spontanées. Toutes les mutations n'entraînent pas heureusement des effets en termes d'initiation d'un processus de cancérogenèse.

Les mutations dangereuses portent en général sur les gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, dans l'embryogenèse ou dans la différenciation cellulaire.

La recherche d'une génotoxicité est au premier rang des recherches d'effet, lorsqu'une cellule est mise en présence d'un xénobiotique. Différents processus de détoxification et de réparation de l'ADN interviennent. Si ces mécanismes sont dépassés, des mutations peuvent apparaître. Si ces mutations sont spécifiques, stables et transmissibles au génome des cellules filles, on considère que la phase d'initiation est complète (Figure 11). Dans ce cas, les phases suivantes peuvent s'enclencher : promotion, progression, invasion (**Binet, 2001**).



**Figure 11** : Activation de la prolifération cellulaire et inhibition de l'apoptose au cours du processus de cancérisation: rôle des agents initiateurs et promoteurs (**Alkhatib, 2010**).

Les substances génotoxiques dans les produits pharmaceutiques, gagnent de plus en plus d'attention. L'effet génotoxique par rapport aux produits pharmaceutiques peut provenir de plusieurs facteurs, y compris les matières premières, des réactifs, des intermédiaires, des solvants ou bien des réactions secondaires indésirables du processus de synthèse d'ingrédients pharmaceutiques actifs qui se reporte dans le produit final. Ces derniers peuvent se décomposer ou interférer avec d'autres excipients pharmaceutiques pour former le produit génotoxique (**Janson, 2009**).

D'une manière générale, les Substances génotoxiques sont celles qui ont un impact sur le matériel génétique par le biais de mutations. Les mutations peuvent être des cassures chromosomiques, des réarrangements, des liaisons covalentes ou des insertions au niveau de l'ADN lors de la réplication. Des mutations peuvent également se produire indirectement par l'activation d'une cellule à produire des substances génotoxiques. Ces changements du matériel génétique, peuvent être causés par une exposition à de très faibles concentrations d'un agent génotoxique, et peuvent conduire au cancer (**Skett, 2007**).

On peut résumer les effets provoqués par un agent toxique par : les mutations pouvant toucher le génome humain (mutagenèse), les capacités de multiplication des cellules (cancérogenèse) ou le développement de l'embryon (tératogenèse) (**Binet et Rihin, 2001**).

### **2.1. Les tests de génotoxicité :**

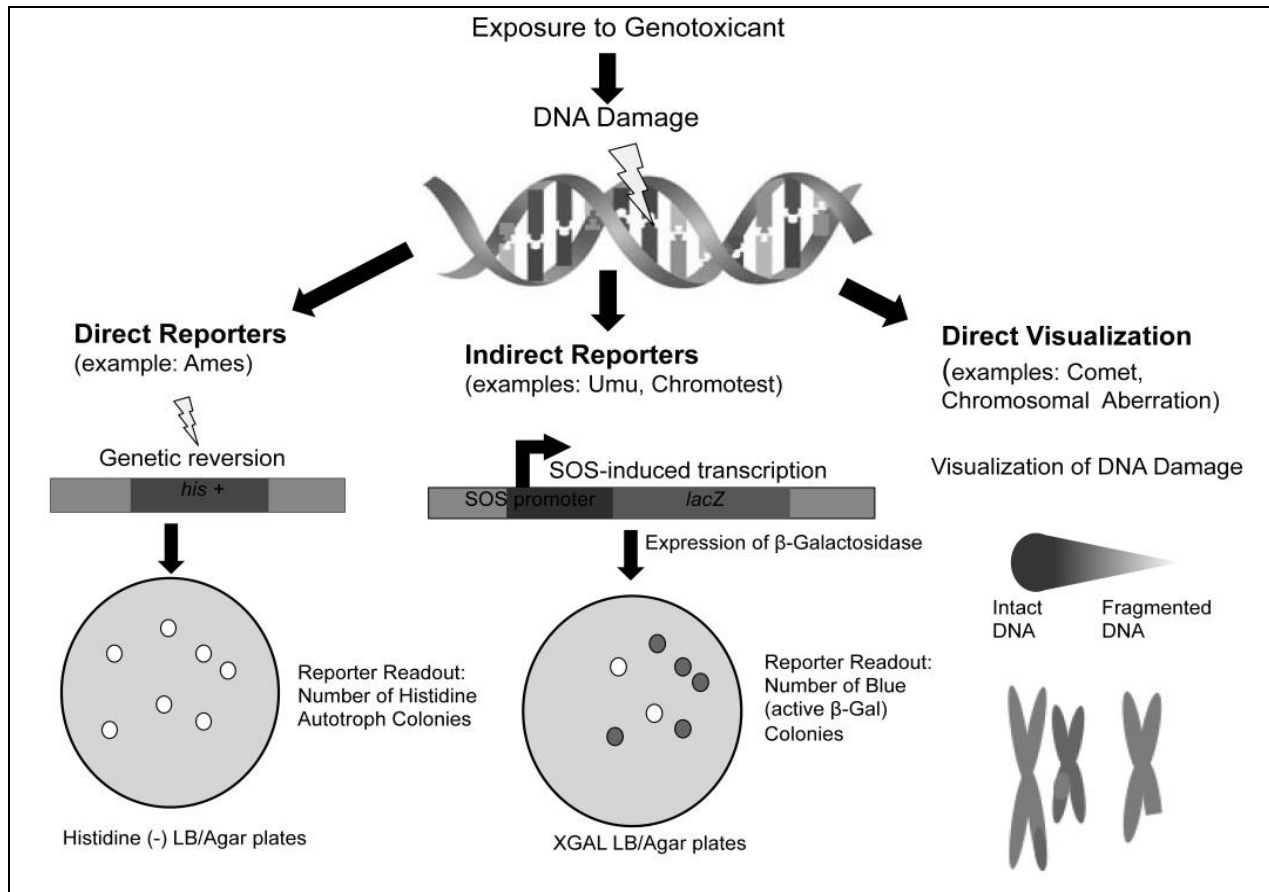
Parmi les méthodes mises au point pour l'étude de la génotoxicité d'un xénobiotique, les tests de mutagenèse sont les tests de choix, se distinguant par leur possibilité de détecter l'action de quantités infimes de toxiques, mais aussi des événements qui surviennent très tôt dans la progression entre l'exposition et la maladie (**Pillière, 2001**).

Les objectifs des différents tests de génotoxicité sont, d'une part l'identification des agents génotoxiques (4 à 10 % des cancers proviendraient de l'exposition à des produits chimiques et industriels), et d'autre part la détermination de leurs modes d'action moléculaires et cellulaires (bio-activation, nature des interactions avec l'ADN, modifications de bases, cassures de brins, pontages, intercalations, substitutions, addition ou délétion de paires de bases, cassures chromatidiennes ou chromosomiques, pertes de chromosomes entiers. . .) (**Binet, 2001 ; Dearfield et Moore, 2005**).

Il existe plusieurs tests de génotoxicité (Figure 12) :

- Le test d'Ames ou test de mutation réverse.
- Le SOS Chromotest.
- Le test de micronucleus.
- Le test des Comètes.
- Le test des aberrations chromosomiques.





**Figure 12 :** Exemples de tests de génotoxicité (Musgrove et Camps, 2012).

### 2.1.1. Le Test d'Ames :

Le test de mutation bactérienne inverse développé par Bruce Ames et ses collègues (1970) est le test à court terme le plus connu et le plus largement utilisé pour détecter et évaluer le potentiel mutagène d'un composé ou d'un mélange de composés (des produits chimiques et mélanges environnementaux, des liquides organiques, des aliments, des médicaments et agents physiques), capables d'induire des altérations génétiques qui conduisent à des mutations géniques.

Ce test utilise des souches histidine-dépendantes afin de détecter des mutations, par exemple des substitutions, des additions, ou des délétions d'un ou de plusieurs nucléotides de l'ADN ce qui permet de revenir à la séquence d'origine du gène modifié dans les souches d'essai (Ames et al., 1973 ; Zeiger, 2014).

Le principe du test d'Ames est d'ensemencer, en présence de l'agent à tester, une gélose avec des bactéries incapables de se développer sur un milieu pauvre en histidine. Si l'agent est mutagène, des colonies de mutants réverses (c'est-à-dire capables de pousser sur un milieu

appauvri en histidine) apparaissent en plus grand nombre que les mutants spontanés. Le nombre de ces colonies est un indicateur de la puissance de l'agent mutagène (**Binet, 2001**).

Le Test d'Ames a de nombreux avantages, c'est un test très polyvalent, qui peut être utilisé pour détecter le potentiel mutagène et antimutagène des produits chimiques de l'environnement, des mélanges de liquides organiques, des aliments, des médicaments, ainsi que des agents physiques (**Pillco et de la Peña, 2014**). Ses différentes modifications ont été développées pour déterminer le potentiel mutagène, et il est recommandé par plusieurs organismes de réglementation (**Tennant et al. 1987 ; Kirkland et al, 2005**).

De nombreux produits chimiques sont biologiquement inactifs dans leurs formes natives et ils doivent être métabolisés, habituellement dans le foie de mammifères, en une forme active. C'est cette forme active qui, dans de nombreux cas, est l'agent causal de mutation, de cancer et d'autres effets. Etant donné que les bactéries utilisées dans le test ne sont pas en mesure d'exécuter ce métabolisme, **Ames et al., (1973)** ont ajouté un homogénat de foie de rat appelé S9 mix, préparé à partir d'un surnageant d'une fraction du foie et de cofacteurs enzymatiques (**Ames et al., 1973. Hakura et al. 2005**).

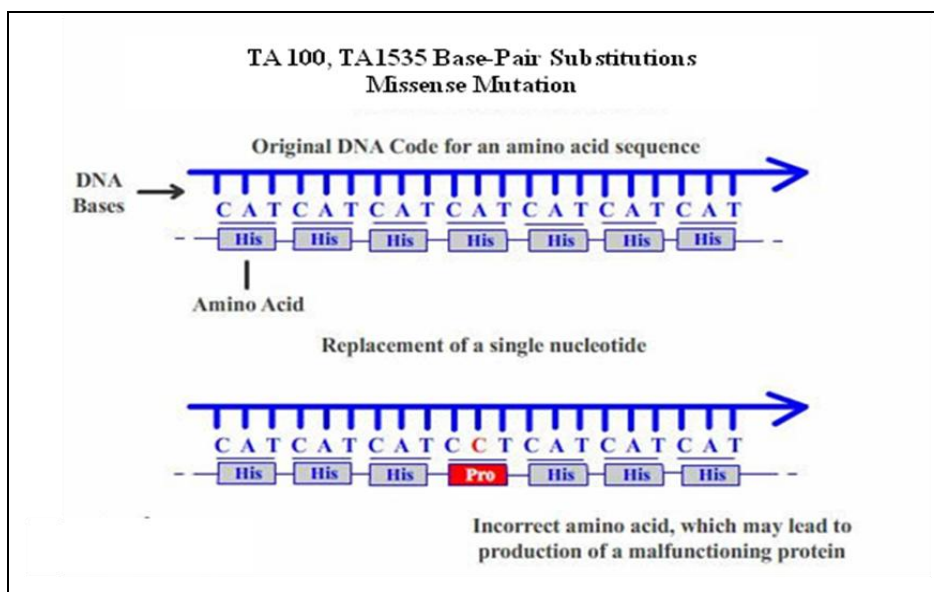
Bien que *Salmonella* soit un organisme procaryote, la combinaison du système d'activation métabolique S9 avec le système de test d'Ames permet la détermination des agents mutagènes (**Zeiger, 2014**).

➤ **Souches bactériennes :**

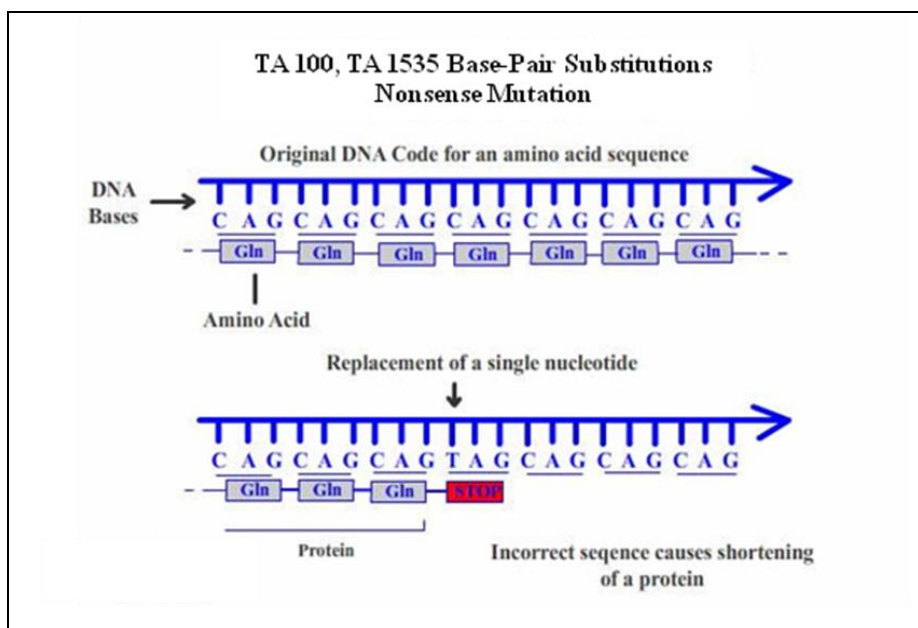
Les souches de *Salmonella* ont été initialement développées pour étudier la génétique de la biosynthèse de l'histidine. Les souches utilisées pour le test présentent des mutations dans les gènes de l'opéron histidine (*his*) du genre substitution de paires de bases (Figure 13 et 14) ou frameshift (décalage du cadre de lecture) (Figure 15).

Ces souches ont été choisies pour l'ensemble du test parce qu'elles sont facilement réversibles par les mutagènes chimiques et représentent différentes cibles moléculaires.

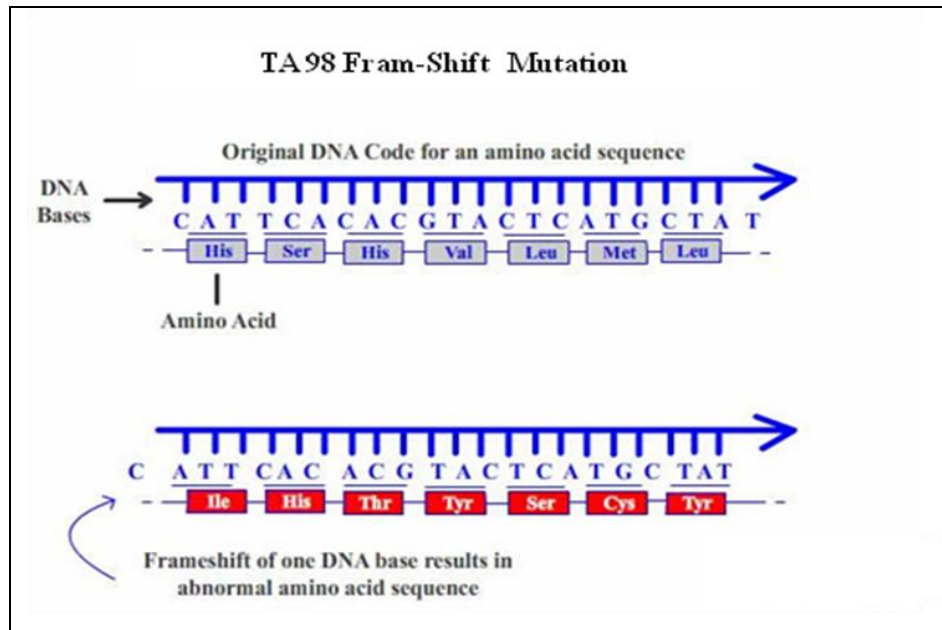
Après traitement avec le mutagène, seules les cellules qui subissent une mutation ultérieure, qui restaure leur capacité à synthétiser l'histidine, sera en mesure de croître et former des colonies sur les boîtes de gélose minimale. Le nombre de colonies révertantes formées après le traitement fournit une mesure du pouvoir mutagène de la substance (**Ames et Whitfield, 1966 ; Mortelmans et Zeiger, 2000 ; Zeiger, 2014**).



**Figure 13 :** La mutation par substitution de paire de bases de type faux sens, des souches de *S. typhimurium* TA100 et TA1535 (Web 4).



**Figure 14 :** La mutation par substitution de paire de bases de type non sens, des souches de *S. typhimurium* TA100 et TA1535 (Web 5).



**Figure 15 :** La mutation frameshift (décalage du cadre de lecture) de la souche *S. typhimurium* TA98 (Web 6).

Différentes mutations sont induites dans les gènes de l'opéron histidine (*his*) :

- Mutation ***hisD 3052*** : la souche **TA98** contient ce genre de mutation, la rendant déficiente en histidinom déshydrogénase. Cette souche détecte les substances qui causent des mutations de type « frameshift », affectant le cadre de lecture d'une séquence à proximité répétitive -CGCGCGCG-  
-GCCGCCGC- (Tableau 2) (Maron et Ames, 1983 ; Mortelmans et Zeiger, 2000).
- Mutation ***hisG 46*** : les souches **TA100** et **TA1535** portent un allèle ***his 46*** déterminé par la séquence -GGG-  
-CCC-. Elles sont déficientes en la première enzyme qui entre dans la synthèse de l'histidine. Ces deux souches détectent les mutations qui causent des substitutions de paires de bases GC (Tableau 2) (Barnes et al., 1982 ; Mortelmans et Zeiger, 2000).
- Mutation ***rfa*** : Cette mutation cause la perte partielle des polysaccharides à la surface de la paroi cellulaire la rendant ainsi déficiente, ce qui la rend perméable aux grandes molécules, incapables de pénétrer dans une cellule normale (Tableau 3) (Maron et Ames, 1983 ; Mortelmans et Zeiger, 2000).
- Mutation ***uvrB*** : La délétion *uvr* supprime le système de réparation d'ADN « excision-resynthèse », ce qui rend la souche plus sensible à la détection des mutagènes. Pour des raisons techniques, la délétion du gène *uvrB* s'étend jusqu'au gène *bio* et par conséquent,

la bactérie devient auxotrophe à la biotine (Tableau 3) (Maron et Ames, 1983 ; Mortelmans et Zeiger, 2000).

- Plasmide **PKM 101** : ce plasmide porte le gène de la résistance à l'ampicilline ; il est présent chez les souches **TA 100** et **TA 98**. Ces souches sont plus sensibles aux mutagènes qui sont faiblement détectés par les autres souches. Le plasmide PKM 101 contient deux gènes amplifiant le processus de réparation SOS de la mutagenèse induite (Tableau 3) (Ames et al., 1973, Mortelmans et Zeiger, 2000).

**Tableau 2:** Phénotype des souches de *S. typhimurium* : **TA98, TA100** et **TA1535** (Li et al., 2013).

Souches	Allèle	Evènement de réversion	ADN cible	Références
<b>TA98</b>	<i>His D3052</i>	Frameshifts	-C-G-C-G-C-G-C-G-	Isono and Yourno (1974)
<b>TA100</b> <b>TA1535</b>	<i>His G46</i>	Base-pair substitution	-G-G-G-	Barnes et al. (1982)

**Tableau 3:** Génotypes des souches de *S. typhimurium* : **TA98, TA100** et **TA1535** (Li et al., 2013).

Diagnostique	TA98	TA100	TA1535	Moyen
<i>his</i>	+	+	+	-L-his
<i>rfa</i>	+	+	+	+L-his(CV disque)
facteur R	+	+	+	+Amp
<i>urvB</i>	+	+	-	+ Gélose nutritive
Revertants	15-75 A	60-220 A	5-20A	
Plasmide	pKM101	pKM101	pas de plasmide	

**Notes :** + croissance; - absence e croissance.

**A :** San activation métabolique.

**L-his :** L- histidine

**Disque CV :** disque de Cristal Violet

**AMP :** ampicilline.

### 2.1.2. Le SOS Chromotest :

Le SOS chromotest, tout comme le test d'Ames, est un test simple et rapide à court terme pour identifier les génotoxines et est facilement adaptable à diverses conditions (Quillardet et Hofnung, 1993).

Ce test évalue, *in vitro*, la capacité d'un agent chimique à induire le système de réparation dit SOS qui est un système de contournement permettant à la réplication de se poursuivre en dépit du blocage occasionné par la présence d'une lésion (Figure 16). En fait, la cellule négocie sa survie au prix d'un certain niveau de mutagenèse.

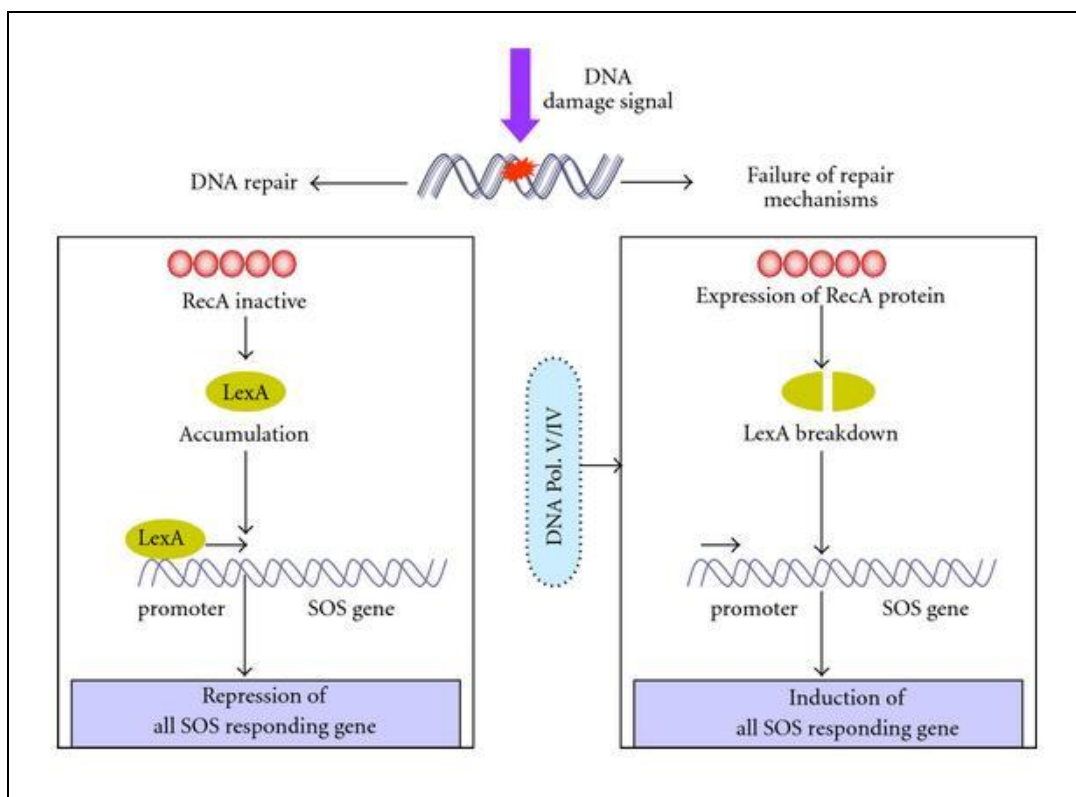


Figure 16 : Principe de la réponse SOS (Web 7).

Le principe de ce test est de combiner la synthèse de la  $\beta$ -galactosidase à l'induction du système SOS. En cas de lésion génétique nécessitant l'intervention du système SOS, la  $\beta$ -galactosidase est exprimée et des colonies d'*E. coli* bleues apparaissent (Binet, 2001).

Chez *E. coli*, plusieurs traitements peuvent endommager, ou inhiber la réplication de l'ADN, induisant ainsi, une série complexe de changements phénotypiques décrits comme une réponse SOS. Parmi ces changements on peut citer la filamentation de la cellule ou l'induction du prophage (Castellazzi et al., 1973).

Le SOS Chromotest fait usage d'une fusion de l'opéron *sfiA::lacZ* où *sfiA* est l'un des gènes SOS (Figure 17). Le test consiste à incuber la souche d'essai avec des concentrations croissantes de l'agent à tester. Après un temps de synthèse des protéines, l'activité de la  $\beta$ -galactosidase est dosée par un test colorimétrique simple. Une activation métabolique (S9) peut être additionnée dans le mélange d'incubation. Le produit chimique testé peut, à certaines concentrations, inhiber la synthèse protéique, ce qui conduirait à une sous-estimation de l'induction de la  $\beta$ -galactosidase. Dans les cas extrêmes, cela aboutirait à de faux négatifs. Pour corriger ceci, la synthèse des protéines au cours de la période d'incubation générale peut être estimée par le dosage de la phosphatase alcaline en parallèle avec la  $\beta$ -galactosidase. Le test est quantitatif et les courbes dose-réponse présentent une région linéaire. La pente de la partie linéaire permet, sans équivoque, l'association de chaque composé actif dans l'induction d'un seul paramètre, et la puissance d'induction SOS (SOSIP) reflète l'activité d'induction du composé (Quillardet et al., 1982).

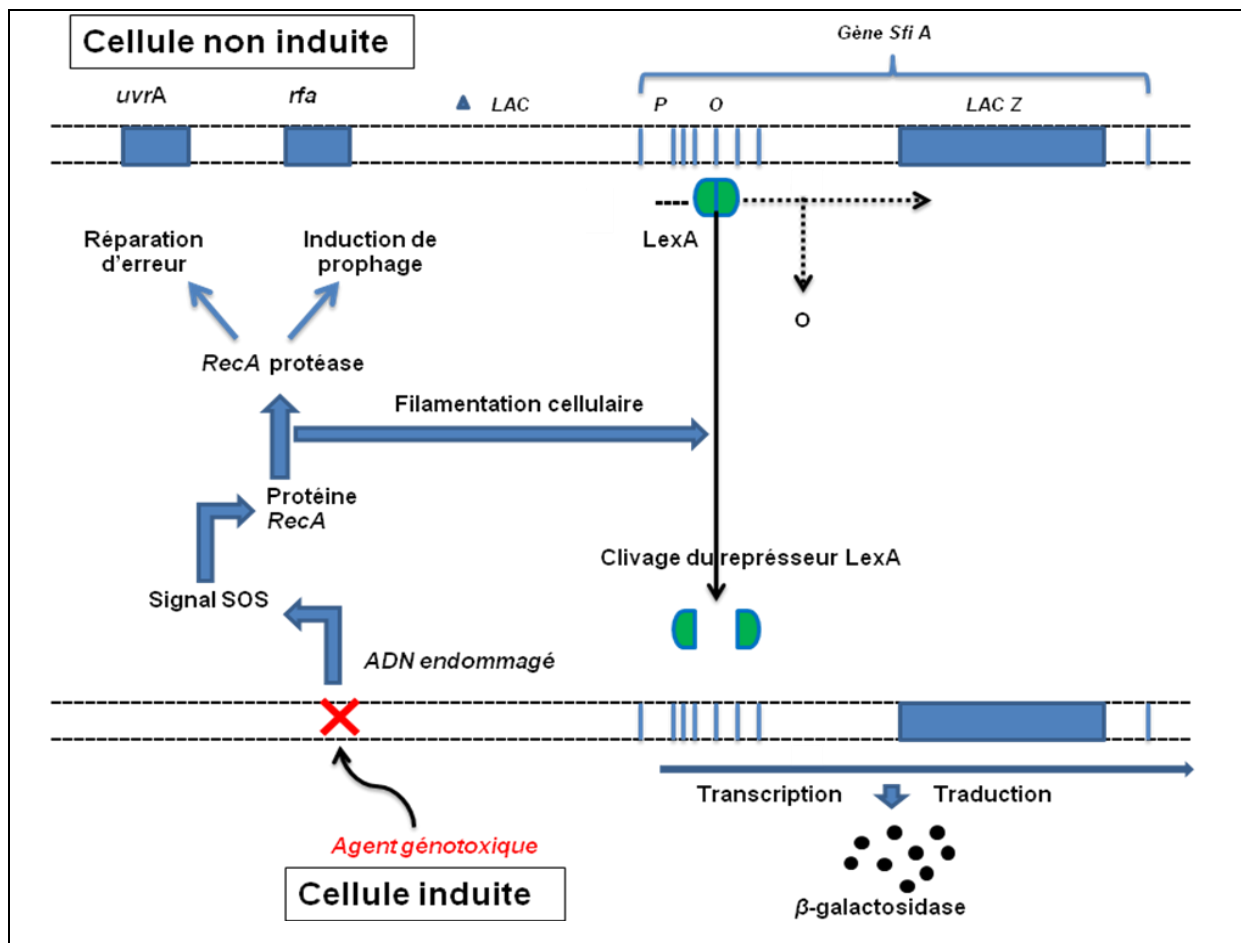


Figure 17 : Principe de la réponse SOS combinée à l'expression de la  $\beta$ -galactosidase dans le SOS Chromotest.

**a. Souche bactérienne *E. coli* PQ37 :**

La souche de *E. coli* PQ37 utilisée dans le SOS chromotest porte une fusion *sfiA::lacZ* et a une délétion de la région *lac* normale, de sorte que l'activité de la  $\beta$ -galactosidase est strictement dépendante de l'expression du gène *sfiA*. Ainsi, lorsque les fonctions SOS sont induites, l'induction de l'opéron *sfiA* se traduit par la production de la  $\beta$ -galactosidase dont on peut déterminer l'activité enzymatique par dosage colorimétrique. En outre, la souche est faite génétiquement plus sensibles aux agents génotoxiques (Quillardet et Hofnung, 1985).

La souche *E. coli* PQ 37 est une souche dérivée de la souche *E. coli* GC4436, elle présente les caractéristiques génétiques suivantes (Quillardet et Hofnung, 1985):

➤ **Fusion *sfiA::lacZ* :**

Cette fusion est obtenue par délétion de la région normale *lac*, donc l'activité de la  $\beta$ -galactosidase est strictement dépendante de l'expression du gène *sfiA*.

➤ **Mutation *uvrA* :**

La souche est dépourvue de la voie de réparation par excision de sorte qu'un nombre de lésions ne sont pas, ou sont peu, traitées.

➤ **Mutation *rfa* :**

Rend l'enveloppe cellulaire plus perméable à un certain nombre de composés suite à un déficit en lipopolysaccharides.

➤ **Mutation *galE* :**

Cette mutation permet la sélection des mutants *rfa* avec le phage C21.

➤ **Mutation PHO :**

Responsable de la synthèse et l'expression constitutive de la phosphatase alcaline, une enzyme indépendante du système SOS et qui sert de témoin pour la toxicité.

➤ **Plasmide pKM 101 :**

Ce plasmide porte le gène de la résistance à l'ampicilline.

**b. Le système de réparation SOS chez la souche d'*E. coli* PQ 37 :**

La réponse SOS (augmentation de la capacité de réparer l'ADN endommagé) joue un rôle central dans la réponse d'*E. coli* aux agents génotoxiques en raison de son large spectre de réponses vers une grande variété d'agents. Le déclenchement du système peut ainsi être utilisé comme un signe



précoce général de dommages à l'ADN. Deux gènes jouent un rôle essentiel : *lexA* code pour un répresseur pour tous les gènes du système (plus de 15 sont connues), *recA* code pour une protéine capable de cliver (ou pour favoriser le clivage) le répresseur *LexA* lors de l'activation du système SOS par un signal d'induction. La nature exacte du signal inducteur SOS reste mystérieuse. Cependant, il est produit lorsqu'une lésion perturbe ou arrête la réplication de l'ADN (**Walker, 1984 ; Devoret, 1992**).

La réponse SOS est initiée par l'interaction de la protéine RecA avec le répresseur LexA (Figure 16).

Les étapes impliquées sont les suivantes:

- Un traitement endommageant active la protéine RecA (une protéase), par des intermédiaires communs (petites molécules d'ADN ou des séquences monocaténaire).
- La protéase RecA interagit avec le répresseur LexA (codée par le gène *lexA*) et en raison de l'action protéolytique de RecA sur LexA, tous les opérons auxquels LexA est lié sont induits (figure 17). Ceci peut inclure un certain nombre de gènes des opérons appelés *DIN* (Dommages Inductible Genes), tels que les gènes *uvrA*, *uvrB*, *uvrC* et *hinA* ou *hisA*. Chacun de ces gènes a une boîte SOS, ayant 20 pb de long et une longue séquence de consensus de 8 pb. Depuis, LexA réprime sa propre synthèse et celle de RecA ; sa dégradation protéolytique conduit à l'amplification des deux protéines LexA et RecA. Toutefois, lorsque le signal endommageant l'ADN est enlevé, RecA n'est pas induite et LexA accumulée, réprime tous les autres gènes appartenant au système SOS (**Janion, 2008**).

Le suivi du déclenchement du système SOS pourrait être effectuée par le dosage des différents points terminaux tels que : l'activation de la protéine RecA, le clivage du répresseur LexA, l'expression d'un quelconque des gènes SOS, etc... Un moyen simple consiste à surveiller l'expression d'un gène SOS au moyen d'une fusion avec *lacZ*, le gène de structure de la  $\beta$ -galactosidase chez *E. coli* (**Quillardet et Hofnung, 1993**).



***MATERIEL ET  
METHODES***

## **1. MATERIEL :**

### **1.1. Les souches bactériennes :**

Dans ce travail, nous avons utilisé des souches bactériennes représentées par des souches cliniques, des souches de référence et des souches génétiquement modifiées (*Salmonella typhimurium* et *E. coli* PQ 37).

- ❖ Les 262 souches cliniques utilisées dans cette étude proviennent du Laboratoire central de Microbiologie, CHU Dorban-Annaba (souches nosocomiales) et de Laboratoires d'analyses médicales (souches communautaires). L'ensemble des souches a été isolé à partir de plusieurs prélèvements biologiques. Ces prélèvements étaient à visée diagnostic. Le recueil des souches a été effectué entre janvier 2010 et janvier 2011.
  
- ❖ Cinq souches de référence provenant de l'Institut Pasteur d'Alger, ont été utilisées comme souches de contrôle :
  - *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
  - *Enterococcus faecalis* ATCC 29212
  - *Escherichia coli* ATCC 25922
  - *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603
  - *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Le contrôle de qualité des souches de référence doit se faire avant chaque manipulation.

Le contrôle de qualité des milieux de culture et des antibiotiques doit se faire à chaque nouveau lot sur les souches de référence. Ce travail de contrôle doit être permanent.

- ❖ Les souches pour le test d'Ames et le SOS Chromotest :

Pour la réalisation du test d'Ames nous avons utilisé des souches de *Salmonella typhimurium* TA100, TA98 et TA1535 (MOLTOX, Molecular Toxicology Inc. USA.).

Pour la réalisation du SOS Chromotest nous avons utilisé une souche d'*E. coli* PQ37 (ebpi : environment bio-detection products inc. CANADA).

### **1.2. *Artemia salina* :**

Pour la réalisation du test de cytotoxicité, *in vitro*, nous avons utilisé un crustacé marin *Artemia salina* (*A. salina*) gracieusement fourni par le Laboratoire des Bioressources Marines, Département des Sciences de la Mer, UMBA.

### **1.3. Les molécules de sulfamides testées :**

Il s'agit de deux nouvelles séries de sulfamides **1a-d** (Tableau 4) et **2a-f** (Tableau 5), synthétisées au niveau du Laboratoire de Chimie Organique Appliquée, Département de Chimie. Des gammes de dilutions de raison géométrique 2 de chaque molécule ont été réalisées, dans l'acétone, de manière à obtenir des concentrations finales allant de 0,5 µg/ml à 512 µg/ml.

Deux médicaments commercialisés ont été utilisés comme témoins positifs (Tableau 6) :

- Témoin 1: **Bactrim**, le sulfaméthoxazole-triméthoprimine (400 / 80mg) (Laboratoire Roche, France).

- Témoin 2: **Sulfaguanidine** (500 mg) (Merck, France).

Ces deux témoins ont été dilués de la même manière que précédemment.

Tableau 4: Structures chimiques des sulfamides 1a-d.

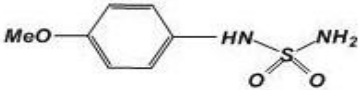
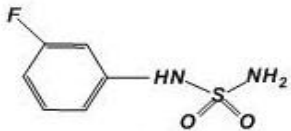
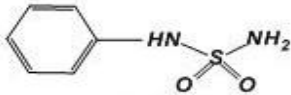
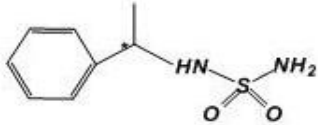
Molécules testées	Nomenclature	Formules moléculaires	PM (g/mol)	Structures chimiques
1a	N-(4-methoxyphenyl) sulfamide	$C_7H_{10}N_2O_3S$	203	
1b	N-(3-fluorophenyl) sulfamide	$C_6H_7N_2O_2SF$	190	
1c	N-(phenyl) sulfamide	$C_6H_8N_2O_2S$	172	
1d	N-(phenylethyl) sulfamide	$C_8H_{12}N_2O_2S$	200	

Tableau 5 : Structures chimiques des sulfamides 2a-f.

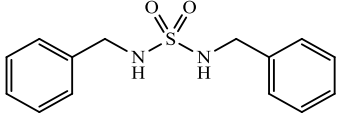
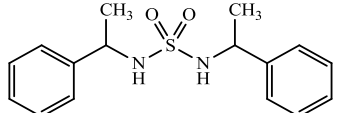
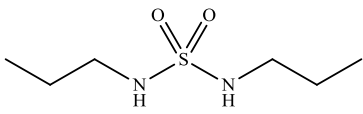
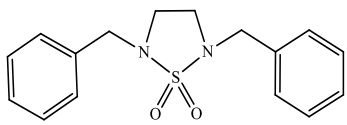
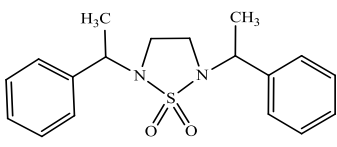
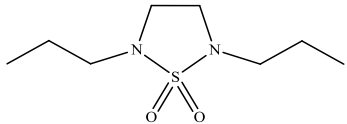
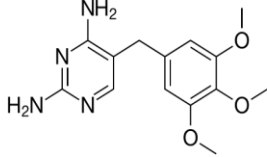
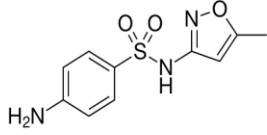
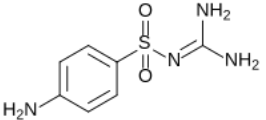
Molécules testées		Nomenclature	Formules moléculaires	PM (g/mol)	Structures chimiques
Sulfamides linéaires	2a	<i>N, N'</i> - Bis (benzyl) sulfamide	$C_{14}H_{16}N_2O_2S$	276	
	2b	<i>N, N'</i> - Bis (phenyléthyl) sulfamide	$C_{16}H_{20}N_2O_2S$	304	
	2c	<i>N, N'</i> -Bis(propyl) sulfamide	$C_6H_{16}N_2O_2S$	180	
Sulfamides cycliques	2d	<i>N, N'</i> -Dibenzyl-1,2,5-thiadiazolidine 1,1-dioxyde	$C_{16}H_{18}N_2O_2S$	330	
	2e	<i>N, N'</i> -bis (1-phenyléthyl)-1,2,5-thiadiazolidine 1,1-dioxyde	$C_{18}H_{22}N_2O_2S$	302	
	2f	<i>N, N'</i> -Dipropyl-1,2,5-thiadiazolidine 1,1-dioxyde	$C_8H_{18}N_2O_2S$	206	

Tableau 6: Structures chimiques des molécules témoins.

Molécules testées	Nomenclature	Formule moléculaire	PM (g/mol)	Structures chimiques
Témoin 1 (Bactrim)	Trimethoprim	$C_{14}H_{18}N_4O_3$	290, 318	
	Sulfamethoxazole	$C_{10}H_{11}N_3O_3S$	253,279	
Témoin 2 (Sulfaguanidine)	Sulfaguanidine (4-Amino-N-[amino(imino)methyl] Benzenesulfonamide	$C_7H_{10}N_4O_2S$	214,249	

#### 1.4. Les Antibiotiques :

Au total, 37 antibiotiques standards ont été utilisés pour l'antibiogramme (Annexe 2).

## 2. METHODES :

### 2.1. Synthèse chimique des séries 1a-d et 2a-f :

La première série de sulfamides **1a-d** a été préparée par un procédé qui implique la réaction du tert-butanol et l'isocyanate de chlorosulfonyle en présence du chlorure de méthylène anhydre à 0°C. Après 30 min, le N-chlorosulfonyl carbamate formé et la triéthylamine sont ajoutés à une solution d'amine primaire dans le même solvant.

Après achèvement de la réaction, le mélange réactionnel a été lavé avec du HCl 0,1 N puis à l'eau. La phase organique a été séchée sur du sulfate de sodium anhydre et concentrée sous vide afin de donner des carboxylsulfamides sous forme de poudre blanche avec un très bon rendement. Une réaction de déprotection des composés obtenus a été réalisée dans l'eau distillée 100°C pendant 30-60 min pour donner les sulfamides **1a-d** avec de bons rendements quantitatifs (Tableau 4) (Boufas et al., 2014).

Les dérivés de sulfamides linéaires symétriques **2a-c** de la deuxième série ont été préparés à partir d'une amine primaire. Les sulfamides cycliques symétriques **2d-f** ont été préparés en deux étapes (duplication-cyclisation) par la réaction d'une amine primaire et du chlorure de sulfuryle en présence de triéthylamine, la réaction a été suivie par TLC. Ces composés ont été obtenus avec de bons rendements, sous forme d'une poudre blanche après traitement par un acide et lavage à l'eau, le résidu est purifié par chromatographie sur colonne. La cyclisation intramoléculaire des composés linéaires 2a-c a été facilement effectuée en utilisant le dibromoéthane en présence du carbonate de potassium dans l'acétone. Les composés **2a-f** (Tableau 5) ont été obtenus sous forme de poudre blanche ou d'une huile jaune avec des rendements compris entre 60 et 65% (**Hessainia et al., 2013**).

## **2.2. Techniques de prélèvements :**

Les prélèvements provenant des divers produits biologiques (urines, sang, pus, sécrétions respiratoires et liquide pleural) ont été réalisés selon les différentes techniques, ainsi que les conditions préanalytiques conformes au Référentiel en Microbiologie Médicale 2010. Les différentes techniques de prélèvements sont mentionnées dans le Tableau 7.

## **2.3. Isolement des souches :**

Les souches ont été isolées et identifiées par le personnel du laboratoire central de Microbiologie du CHU Dorban, ainsi que par le personnel de chaque laboratoire où les souches ont été isolées. Des informations concernant chaque prélèvement effectué ont été recueillies de manière prospective : le type du prélèvement, la date, l'âge et le sexe du patient.

Néanmoins, tous les isolements et toutes les identifications préalablement réalisés par les différents laboratoires ont été refaits et confirmés au niveau du laboratoire de Biochimie et Microbiologie Appliquées du Département de Biochimie, en utilisant des milieux de culture sélectifs pour l'isolement des différentes souches bactériennes : Gélose nutritive, gélose Mac Conkey, gélose Hecktoen, gélose Chapman, gélose Cetrimide et gélose au sang.



**Tableau 7 : Conditions pré-analytiques des prélèvements conformes au Référentiel en microbiologie médicale (2010).**

<b>Paramètres et volume recommandé</b>	<b>Fréquence d'analyse et particularités</b>	<b>Température de transport ou de conservation</b>	<b>Délai d'analyse approprié</b>	<b>Matériel de recueil de prélèvement</b>
<b>Urines (ECBU 10 ml d'urine)</b>	Continue Urine du matin ou après 4 h de séjour dans la vessie	2-8 °C Température ambiante	< 4 h < 2 h	Flacon stérile
<b>Urine (Sonde urinaire)</b>	Continue Désinfection de la paroi Prélèvement à la seringue	Température ambiante	< 2 h	Flacon stérile
<b>Examen d'un pus et écoulements</b>	Continue Prélèvement à la seringue conseillé Ecouvillon	Température ambiante	< 2 h	Flacon stérile 2 écouvillons
<b>Prélèvement distal protégé</b>	Continue Prélèvement par cathéter	Température ambiante	Immédiat	Flacon stérile contenant 1 ml d'eau physiologique
<b>Hémoculture (quantité par flacon) 5 -10 ml de sang total (adulte) 1-2 ml de sang total (enfant)</b>	Continue 2 ou 3 hémocultures par 24 h	Température ambiante	< 12 h	Flacons pour hémocultures (1 aérobie et 1 anaérobie)
<b>Coproculture 3 noix de selles (3 ml ou 3 grammes de selles)</b>	Continue Urgence pour le syndrome hémolytique et urémique	Température ambiante Ou 2-8 °C	< 2 h ou < 12 h	Flacon coproculture
<b>Prélèvement vaginal</b>	Continue Prélèvement cul-de-sac et endocol	Température ambiante	< 2 h	2 écouvillons
<b>Spermoculture</b>	Continue Désinfection du gland	Température ambiante	< 2 h	Flacon stérile
<b>Liquide pleural (3 ml)</b>	Continue Désinfection cutanée	Température ambiante	< 2 h	Tube stérile Flacon d'hémoculture

## **2.4. Purification et identification des souches :**

La purification et l'identification des souches ont été faites selon les méthodes conventionnelles. Après incubation, on examine l'aspect des colonies ayant poussé sur les milieux de culture. Lorsque les boîtes contiennent plusieurs types de colonies, on procède à la purification de la souche en réalisant des repiquages successifs.

L'identification des souches a été réalisée selon les étapes suivantes :

- Observation de l'état frais.
- Coloration de Gram.
- Test de l'oxydase.
- Test de la catalase.
- Identification par le système API, (API 20E, API STAPH, APINE) (Annexe 1).

Des tests complémentaires ont été réalisés pour les souches de *Staphylococcus aureus*.

### **2.4.1. Tests spécifiques aux *Staphylococcus aureus*:**

#### **2.4.1.1. Recherche de la staphylo-coagulase :**

##### ***a. Principe :***

La coagulase est une enzyme produite par *Staphylococcus aureus* capable de coaguler le plasma du lapin ou le plasma humain (Rahal, 2005).

##### ***b. Protocol expérimental :***

- A partir du milieu Chapman, prendre une colonie ayant fermenté le mannitol et la mettre dans le bouillon cœur-cerveille.
- Incuber à 37 °C pendant 18 h.
- Ajouter, dans un tube à hémolyse contenant 0,5 ml de dilution de plasma de lapin, 0,5 ml de bouillon de culture et incuber à 37 °C pendant 30 min dans un bain Marie.
- La coagulation est observée en un temps inférieur à 3 h, on prolonge l'incubation pendant 24 à 48 h.
- Effectuées les lectures toutes les heures au moins pendant les cinq premières heures.

##### ***c. Lecture :***

La formation d'un caillot indique une coagulase positive.

#### **2.4.1.2. Recherche de la résistance de *Staphylococcus aureus* à l'oxacilline :**

➤ **Test de diffusion du disque de Céfoxitine :**

La résistance de *S. aureus* à l'Oxacilline est recherchée à l'aide d'un disque de Céfoxitine (30 µg) dans les conditions standards (Rahal, 2005).

Pour une souche de *S. aureus*, si le diamètre de la zone d'inhibition autour d'un disque de Céfoxitine est :

- Inférieur ou égal à 19 mm, la souche est dite résistante à l'oxacilline.
- Compris entre 19 et 20 mm la souche est d'une sensibilité diminuée.
- Supérieur ou égale à 20 mm, la souche est dite sensible à l'oxacilline.

Devant tout problème d'interprétation, faire un test de confirmation par la technique de screening à l'oxacilline.

➤ **Test de screening à l'oxacilline pour *Staphylococcus aureus* :**

Devant tout problème d'interprétation du diamètre d'inhibition de la céfoxitine on réalise un screening test (Rahal, 2005).

##### **a. Protocol expérimental :**

- Additionner à la gélose Mueller Hinton 4% de NaCl, la solution d'oxacilline 6 µg/ml.
- La préparation de la solution d'oxacilline se fait de la manière suivante :
  - \* Diluer 6 mg d'oxacilline (poudre injectable) dans 10 ml d'eau distillée stérile, puis faire une dilution au dixième.
  - \* Répartir la solution obtenue à raison de 2 ml par tube; ainsi conditionnées ces solutions peuvent être conservées à -20°C pendant une semaine.
- Mettre 2 ml de cette solution dans une boîte de 90 mm de diamètre ; ajouter 18 ml de gélose Mueller Hinton additionnée de 4% de NaCl.
- Mélanger en faisant des mouvements rotatoires.
- Préparer un inoculum à partir d'une culture pure de 18 h sur milieu d'isolement ; racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.
- Décharger l'ance dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile à 0,9%.
- Bien homogénéiser la suspension bactérienne ; son opacité doit être équivalente à une DO de 0,08 lue à 625 nm.
- L'ensemencement doit se faire dans les 15 mn qui suivent la préparation de l'inoculum ; il se fait par spot, en appliquant verticalement sur la gélose l'extrémité d'un écouvillon trempé dans la suspension bactérienne (ou ensemencer un cadran en entier).

Les souches de référence doivent être testées dans les mêmes conditions :

*S. aureus* ATCC 29213 souches sensibles à l'oxacilline.

*S. aureus* ATCC 43300 souche résistante à l'oxacilline.

- Incuber pendant 24 h à  $35 \pm 2$  °C.

**c. Lecture :**

La poussée de plus d'une colonie de la souche test suffit pour indiquer une résistance à l'oxacilline, impliquant une résistance à toutes les  $\beta$ -lactamines.

**2.5. L'antibiogramme standard :**

Un antibiogramme standard utilisant 37 antibiotiques (Annexe 2) a été réalisé selon les recommandations du CLSI (2009), afin de déterminer la résistance ou la sensibilité des différentes souches cliniques.

**a. Principe :**

L'antibiogramme est une méthode simple, appliquée en routine à toute bactérie considérée comme pathogène, en vue de guider le choix thérapeutique du clinicien (Boulahbal, 2006).

L'antibiogramme est une méthode qualitative (réponse : Sensible, Intermédiaire et Résistant), qui doit permettre d'explorer un grand nombre d'antibiotiques vis-à-vis de chaque souche (Bosgiraud, 2003).

La méthode consiste à déposer des disques d'antibiotiques à la surface de la gélose coulée dans des boîtes de Petri, etensemencées avec le germe à étudier. Ces disques sont chargés d'une quantité d'antibiotique déterminée de telle sorte que les concentrations diffusants dans la gélose correspondent aux taux sériques obtenus avec les doses usuelles.

Chaque antibiotique diffuse au sein de la gélose et y détermine des gradients de concentrations inversement proportionnels à la distance du disque. Après incubation, les boîtes seront examinées (CLSI, 2009).

**b. Protocol expérimental :**

Les antibiogrammes ont été réalisés sur gélose Mueller-Hinton (Sigma, France) par la méthode de diffusion en gélose.

- Couler la gélose Mueller-Hinton en boîtes de Pétri sur une épaisseur de 4 mm.

- Sécher les géloses avant emploi.

- Préparer un inoculum à partir d'une culture pure de 18 h sur milieu d'isolement ; racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.

- Décharger l'ance dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile à 0,9%.
- Bien homogénéiser la suspension bactérienne ; son opacité doit être équivalente à une DO de 0,08 lue à 625 nm.
- L'ensemencement doit se faire dans les 15 mn qui suivent la préparation de l'inoculum.
- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne.
- L'essorer en le pressant fermement (en le tournant) sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum.
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées.
- Répéter l'opération trois fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

Dans le cas où l'on ensemence plusieurs boîtes de Pétri, il faut recharger l'écouvillon à chaque fois.

- Tester la liste des antibiotiques indiqués selon la bactérie isolée. Les disques d'antibiotiques doivent être espacés de 24 mm, centre à centre.
- Presser chaque disque d'antibiotique à l'aide d'une pince bactériologique stérile pour s'assurer de son application. Une fois appliqué, le disque ne doit pas être déplacé.
- Incuber pendant 18 h à 37° C.

### ***c. Lecture :***

La lecture se fait en mesurant avec précision les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse métallique, à l'extérieur de la boîte fermée.

Comparer ces résultats aux valeurs critiques figurant dans les tables de lecture.

Classer la bactérie dans l'une des catégories : Sensible, Intermédiaire ou Résistante.

## **2.6. Evaluation de l'activité des nouvelles molécules de sulfamide :**

### **2.6.1. Préparation des dilutions :**

Nous avons préparé différentes dilutions des sulfamides **1b-d** et **2a-e** à tester à partir de la poudre diluée dans de l'acétone. Une quantité égale à 5,12 mg du sulfamide est diluée dans 10 ml d'acétone. Une série de dilution géométrique de raison 2 est préparée dans de l'eau distillée stérile à partir de la première concentration de 512 µg/ml.

Les concentrations obtenues s'échelonnent entre 0,5 µg/ml et 512 µg/ml.

Les molécules de sulfamide **1a** et **2f**, sont sous forme d'huile. Une solution mère de concentration connue est préparée, à partir de laquelle les dilutions sont calculées puis préparées de façon à avoir des concentrations allant de 512 µg/ml jusqu'à 0,5 µg/ml.

## **2.6.2. Détermination des diamètres des zones d'inhibition :**

### ***a. Principe :***

Le principe de la méthode utilisée (méthode de Kirby-Bauer, 1966), consiste à mesurer le diamètre d'inhibition de la croissance microbienne autour du papier buvard imprégné d'une concentration fixe de la molécule testée, déposée à la surface de la gélose. Chaque concentration du sulfamide diffuse dans la gélose formant ainsi une zone d'inhibition qui sera mesurée 24 h après incubation à 37°C (**Boulahbal, 2006**).

### ***b. Protocol expérimental (Figure 18) :***

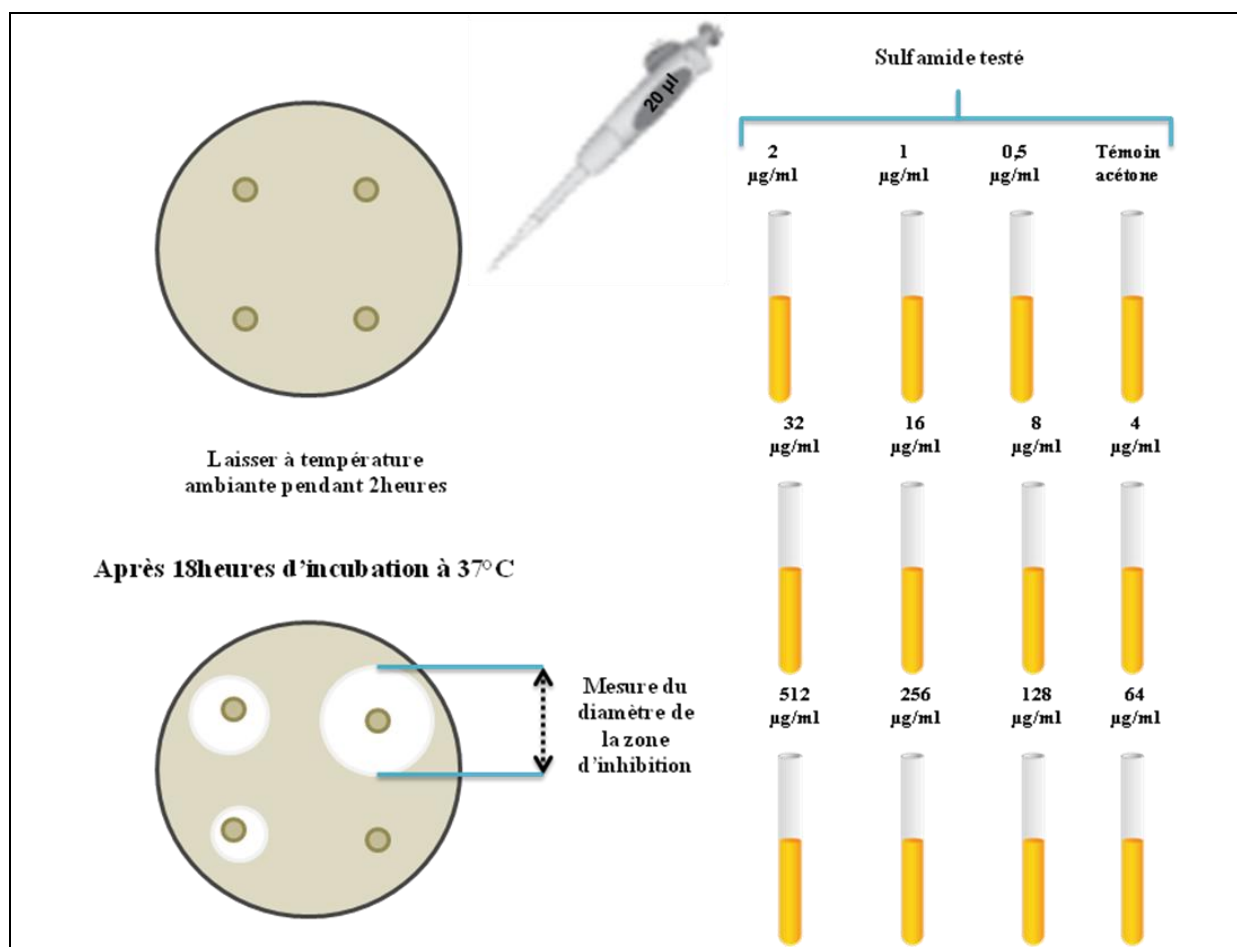
L'ensemencement des boîtes de Petri est effectué de la même façon que pour la technique de l'antibiogramme.

L'Application des molécules de sulfamide se fait comme suit :

- Déposer quatre disques de papier buvard stérile dans chaque boîte de Petri à l'aide d'une pince stérile ; chaque molécule de sulfamide et chaque souche clinique sont testés en triplicate.
- Verser 20 µl de sulfamide sur le disque en utilisant la micropipette munie d'embout stérile.
- Verser 20 µl d'acétone sur un disque de papier buvard en tant que témoin.
- Laisser les boîtes à température ambiante pendant 2 h.
- Incuber pendant 18 h à 37° C.

### ***c. Lecture :***

La lecture se fait en mesurant avec précision les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse métallique, à l'extérieur de la boîte fermée.



**Figure 18 :** Détermination des diamètres des zones d'inhibition des nouvelles molécules de sulfamides **1a-d** et **2a-f**.

### 2.6.3. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) :

#### a. Principe :

C'est la plus petite concentration d'antibiotique qui inhibe toute culture visible d'une souche bactérienne après 18 heures de culture à 37° C.

Dans une série de tubes, on répartit une quantité égale de bouillon nutritif ensemencé d'une dose connue de la souche bactérienne à étudier.

On distribue ensuite dans les tubes, l'antibiotique à tester en quantité croissante. Le premier tube ne reçoit que la bactérie en suspension et constitue le tube témoin (T) sans antibiotique. L'ensemble des tubes est mis à l'étuve à 37° C. La croissance bactérienne dans chaque tube sera évaluée sur la DO en fonction du temps d'incubation, ou par rapport au témoin (**Boulahbal, 2006**).

***b. Protocol expérimental (Figure 19):***

- Préparer une série de 12 tubes stériles pour chaque souche contenant chacun 9 ml de bouillon nutritif.
- Le 12<sup>ème</sup> tube ne reçoit que la bactérie en suspension et constitue le témoin positif.
- Etiqueter chaque tube (souche +dilution).
- Préparer un inoculum à partir d'une culture pure de 18 h ; sur milieu d'isolement, racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.
- Décharger l'anse dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile à 0,9%.
- Bien homogénéiser la suspension bactérienne.
- Ensemencer les tubes en ajoutant un inoculum à partir de chaque suspension dans les tubes.
- Le tube 1 ne contient pas de sulfamide, c'est le témoin. Les tubes de 2 à 11 contenant chacun 1 ml de sulfamide avec des concentrations croissantes : 0,5, 1, 2, 4 jusqu'à 512 µg/ml.
- Incuber à 37° C pendant 18 h.

***c. Lecture :***

La lecture se fait par comparaison avec le tube témoin ; la dilution qui donne le premier tube clair c'est-à-dire pas de croissance bactérienne, détermine la CMI (**Rahal, 2005**).



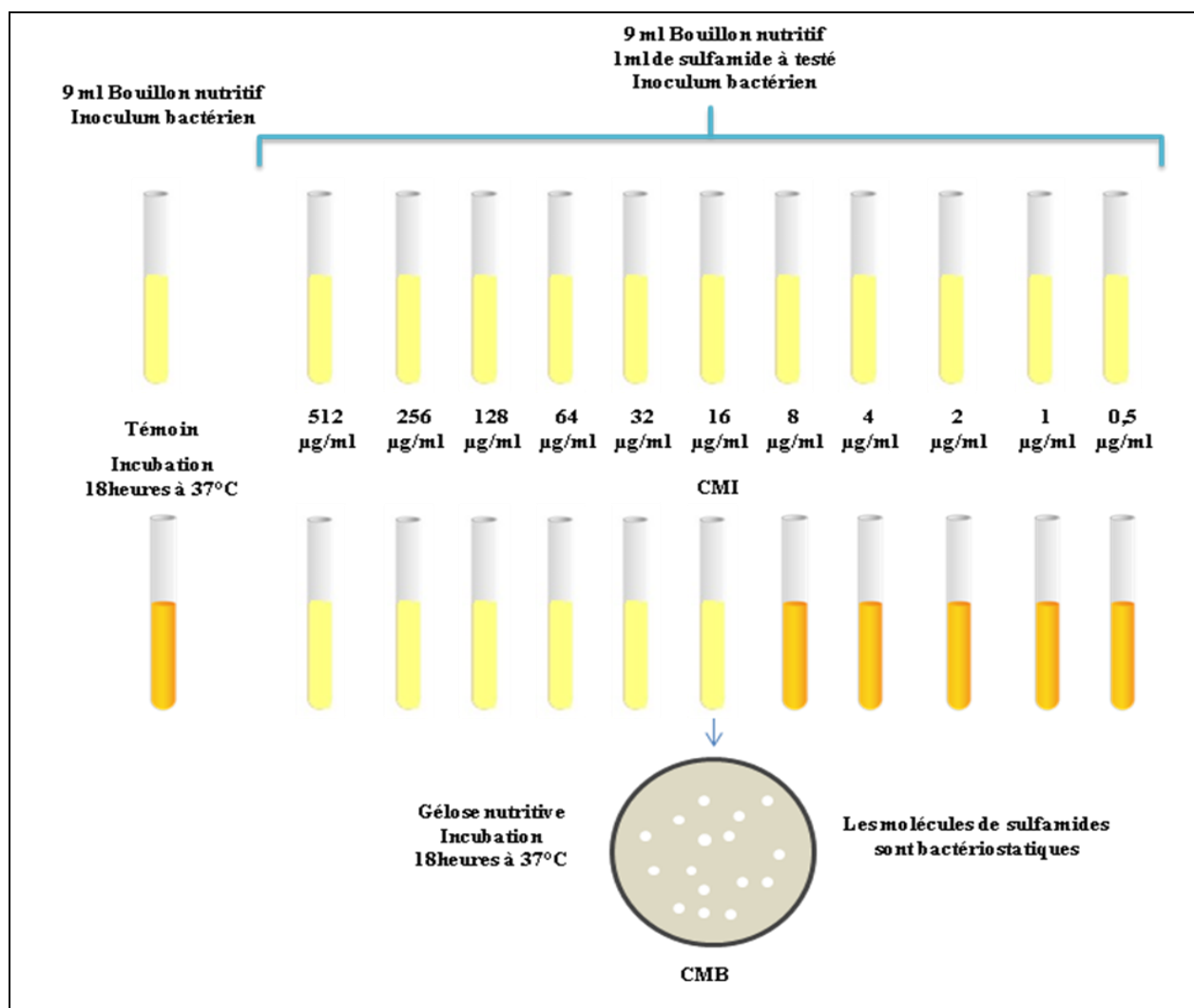


Figure 19 : Détermination de la CMI et la CMB des nouvelles molécules de sulfamides **1a-d** et **2a-f**.

#### 2.6.4. Détermination de la CMI<sub>50</sub> et la CMI<sub>90</sub> :

##### a. Détermination de la CMI<sub>50</sub> :

La concentration de chaque agent antimicrobien, qui inhibe 50% (MIC<sub>50</sub>) des souches, a été calculé pour chaque sulfamide testé selon la formule géométrique suivante (Smith et al., 1986 ; Hojabri et al., 2013):

$$CMI_{50} = (M < 50) + \frac{(n - X) \times [(M > 50) - (M < 50)]}{Y}$$

**M < 50** : CMI du pourcentage cumulatif le plus élevé au-dessous de 50%.

**M > 50** : CMI du pourcentage cumulé le plus bas au-dessus de 50%.

**n** : égal à 50% du nombre des organismes testés.

**X** : nombre d'organismes présents dans le groupe en M < 50.

**Y** : nombre d'organismes dans le groupe à M > 50.

**b. Détermination de la CMI<sub>90</sub> :**

La concentration de chaque agent antimicrobien, qui inhibe 90% (MIC<sub>90</sub>) des souches, a été calculé pour chaque sulfamide testé selon la formule géométrique suivante (Smith et al., 1986 ; Hojabri et al., 2013):

$$CMI_{90} = (M < 90) + \frac{(n - X) \times [(M > 90) - (M < 90)]}{Y}$$

**M < 90** : CMI du pourcentage cumulatif le plus élevé au-dessous de 90%.

**M > 90** : CMI du pourcentage cumulé le plus bas au-dessus de 90%.

**n** : égal à 90% du nombre des organismes testés.

**X** : nombre d'organismes présents dans le groupe en M < 90.

**Y** : nombre d'organismes dans le groupe à M > 90.

**2.6.5. Détermination de la CMB :**

**a. Principe :**

C'est la plus petite concentration d'antibiotique ne laissant subsister que 0,01% ou moins de survivants de l'inoculum initial après 18 h de culture à 37° C. Cette valeur caractérise l'effet bactéricide d'un antibiotique.

**b. Protocol expérimental (Figure 19) :**

Un volume de 0,1 ml de tous les tubes qui ne montrent pas de turbidité est subcultivé sur un milieu de gélose nutritive et incubé à 37° C pendant 18 h.

**2.6.6. La cinétique d'action des molécules de sulfamides :**

**a. Principe :**

La cinétique d'action des nouvelles molécules de sulfamides ou la courbe de bactéricidie, est un pré-requis indispensable lors de l'évaluation du potentiel antibactérien de nouvelles molécules. Elle permet de suivre l'évolution de la croissance bactérienne sur 24 heures, voire 48 heures, avec des prélèvements à différents intervalles de temps (0, 2, 4, 6, 8 ... 24 et 48 h) (Grare et al., 2010).

**b. Protocol expérimental :**

Les suspensions bactériennes ont été préparées dans l'eau physiologique stérile à une DO de 0,08 lue à 625 nm puis inoculées dans un bouillon Muller-Hinton.

Les dérivés de sulfamide ont été ajoutés à la concentration de la CMI déterminées précédemment.

Une souche bactérienne seule sans traitement avec le sulfamide a été utilisée en tant que témoin de la croissance bactérienne.

La DO à 625 nm est mesurée chaque 2 h d'incubation pendant 48 h (0, 2, 4, 8, 12, 24 et 48 h).

#### **2.6.7. Control de la stabilité des molécules testées :**

La synthèse chimique des sulfamides ayant fait l'objet de ce travail a été finalisé en Juin 2012. Ainsi, notre travail s'est étalé sur la période de 4 ans allant de Juin 2011 à Juin 2015.

Ces molécules ont été conservées à température ambiante, loin de la lumière et de l'humidité. Nous avons évalué la stabilité des molécules de sulfamides testés, périodiquement tous les 3 mois sur les souches de références, et ce, pendant toute la période de notre travail.

D'autre part, cette évaluation a été également réalisée grâce à une Chromatographie sur Couche Mince (CCM) afin de confirmer la stabilité et mettre en évidence une éventuelle dégradation des molécules.

##### **a. Principe :**

La chromatographie est une méthode d'analyse chimique de séparation physique, d'identification et de purification d'une molécule ou d'un mélange de molécules; elle est basée sur les différences d'affinité des substances à l'égard de deux phases, une phase stationnaire solide (support en silice), une phase mobile liquide (éluant) constituée par un système de solvant.

Elle consiste à placer sur une feuille (papier, silice ou autre) une tache et de la laisser éluer en la trempant dans un solvant ou un mélange de solvant (appelé éluant). L'éluant diffuse le long du support. La tache migre sur la feuille plus ou moins vite selon la nature des interactions qu'elle subit de la part du support et de l'éluant (**Levine, 1990**).

##### **b. Protocol expérimental (Bounias, 1983 ; Levine, 1990):**

###### **➤ Préparation de la cuve**

Une cuve de chromatographie se compose de la cuve et d'un couvercle. Le couvercle sert d'une part à éviter l'évaporation du solvant mais surtout à réaliser la CCM en atmosphère saturée (pression de vapeur saturante du solvant), de façon à avoir des valeurs reproductibles.

- Préparer l'éluant en respectant les proportions du mode opératoire : Dichlorométhane (caractère polaire croissant des molécules) plus quelques gouttes (2 à 3 gouttes) de Méthanol afin d'augmenter la polarité.
- placer 5 mm d'éluant au le fond de la cuve, puis fermer le couvercle.
- Découper les plaques de CCM aux dimensions convenables.
- Tracer au crayon un trait à 1 cm au bas de la plaque.

- Sur ce trait marquer 2 petits points à 1,5 cm de distance où seront déposés les taches (une tache correspond à la molécule témoin conservée en poudre ou huile, l'autre tache correspond à la molécule en dilution).
- Déposer à l'aide d'un capillaire fabriqué *in situ* avec une pipette pasteur les solutions sur chaque point.
- Vérifier la densité du dépôt (de la molécule) sous lampe UV 265 nm.

➤ **Elution ou migration :**

- Placer la plaque dans la cuve, fermer et laisser l'éluant diffuser.
- Arrêter la CCM lorsque le front d'éluant est arrivé à 1 cm du haut de la plaque (cette opération prend 15 min, et dépend du support et de l'éluant).
- Retirer la plaque et tracer au crayon le front de l'éluant.
- Sécher la plaque au pistolet.

➤ **Révélation**

Certains composés sont colorés : il n'est pas nécessaire de les révéler. La plupart sont incolores (molécules contenant des cycles aromatiques) et c'est le cas de nos molécules de sulfamides.

Dans ce cas la révélation se fait en mettant en contact la plaque CCM avec les UV, ensuite on utilise un révélateur atomisant.

- Révélation UV :

Placer la plaque sous une lampe UV à 265 nm ; si elle est fluorescente, toute la plaque apparaît verte sauf là où sont les taches que l'on entoure au crayon. Les dérivés aromatiques absorbent l'UV ; on entoure les taches colorées.

- Révélation par atomisation :

Cette technique utilise le ninhydrine comme révélateur pour les acides aminés (taches violettes qui brunissent puis disparaissent en quelques jours)

La plaque CCM est plongée dans la solution de ninhydrine, puis retirée et séchée à l'aide d'un pistolet.

➤ **Interprétation**

La position finale de la tache (ou spot) est caractéristique de la molécule.

Selon le niveau de migration des deux spots, on peut conclure que la molécule est restée intègre ou a subi une dégradation, révélée par l'apparition de plusieurs spots sur la même ligne de migration.

## **2.7. Evaluation de la cytotoxicité :**

### **a. Principe :**

Le test de cytotoxicité permet la recherche d'un effet toxique sur un type cellulaire par une méthode évaluant un paramètre donné, dans notre cas la viabilité/létalité cellulaire, dans le but de déterminer la concentration qui tue 50% des organismes (LC50).

La cytotoxicité est évaluée en utilisant un test biologique simple pour la détection de substances toxiques vis-à-vis d'un petit crustacé ou un système zoologique appelé *Artemia salina* (*A. salina*) ou encore les crevettes de saumure. La technique se base sur la détermination de la valeur de la CL50 en µg/ml des molécules de sulfamides présents dans le milieu (Meyer et al., 1982).

### **b. Protocol expérimental :**

L'évaluation de l'effet cytotoxique des nouvelles molécules de sulfamides **1a-d** et **2a-f** a été réalisée et interprétée selon Geran et al., (1972) et Meyer et al., (1982).

#### ➤ **Préparation des échantillons :**

- Les dérivés de sulfonamides des deux nouvelles séries **1a-d** et **2a-f** testées ont été dilués dans de l'acétone, puis des dilutions géométriques de raison 2 ont été préparées allant de 0,5 µg/ml à 512 µg/ml.

- 0,5 ml de chaque dilution est transféré dans un tube stérile ; 3 tubes sont préparés pour chaque dilution de chaque molécule.

#### ➤ **L'éclosion de l'*Artemia salina*:**

L'éclosion des œufs des crevettes de saumure se fait dans une cuve plate rectangulaire peu profonde (22 x 32 cm) remplie d'eau de mer artificielle préparée avec un mélange de sels commerciaux et d'eau distillée.

Un séparateur en plastique avec plusieurs trous de 2 mm a été introduit dans la cuve de façon à avoir deux compartiments inégaux. Les œufs (50 mg) ont été dispersés dans le compartiment le plus grand qui a été rendu sombre, tandis que le petit compartiment reste exposé à une source de lumière.

Après 48 heures, les nauplii phototrophes (larves d'*A. salina*) sont recueillies à l'aide d'une pipette du côté éclairé de la cuve après avoir été débarrassées de leur coquilles.

#### ➤ **Procédure du test :**

- Transférer dix nauplii récupérés à l'aide d'une pipette Pasteur (capillaire en verre) dans un tube à essai contenant 4 ml d'eau de mer artificielle et 0,5 ml du composé à tester à la concentration

voulue ; compléter le volume à 5 ml avec la solution d'eau de mer artificielle. Chaque concentration est testée en triplicate.

- Préparer un tube témoin contenant 5 ml de la solution d'eau de mer artificielle, deux gouttes d'acétone et dix nauplii.
- Ajouter une suspension de levure sèche (3 mg dans 5 ml d'eau de mer artificielle) dans chaque tube comme source de nourriture aux nauplii.
- Maintenir les tubes à température ambiante pendant 24 h sous légère source de lumière.

**c. Lecture :**

Après 24 h, comptabiliser les nauplii (larves) survivantes dans chaque tube.

La Concentration létale 50 (LC50) de chaque molécule de sulfamide a été calculée à l'aide de du logiciel Prism 5.

**2.8. Evaluation de la génotoxicité :**

➤ **Préparation des dilutions :**

Etant donné que l'acétone est toxique vis-à-vis des souches de *S. typhimurium* utilisées dans le test d'Ames, nous avons préparé les différentes dilutions des sulfamides à tester dans le DMSO qui est le solvant de choix pour ce test. Doté d'une DL50 supérieure à 10 g/kg par voie orale chez la plupart des espèces le DMSO peut être considéré comme une substance relativement atoxique (Bégin et al., 2002).

Les dilutions ont été préparées de la même façon que l'activité antibactérienne.

**2.8.1. Le test d'Ames :**

Le test d'Ames a été réalisé selon la méthode de préincubation décrite par Maron et Ames, (1983).

La technique de préincubation est jugée plus sensible que celle de l'incorporation car les métabolites mutagènes peuvent avoir une meilleure chance de réagir avec les souches tests dans un petit volume de préincubation (Mortelmans et Zeiger, 2000).

**a. Principe :**

Le test d'Ames est un test à court terme basée sur des mutations réverses spécifiquement conçu sur des bactérien pour détecter un large éventail de substances chimiques qui peuvent produire des dommages génétiques qui conduisent à des mutations de gènes.

Ce test utilise des souches de *Salmonella typhimurium* histidine-dépendantes. Ces souches présentent des mutations dans le gène de l'opéron histidine de type substitution de paires de bases (TA100 et TA1535) ou frameshift (TA98) et ont été choisis parce qu'elles sont facilement

réversibles par les agents chimiques mutagènes. Ainsi, elles subissent une mutation ultérieure qui restaure leur capacité à synthétiser l'histidine et seront en mesure de croître et former des colonies sur les boîtes de gélose minimale. Le nombre de colonies révertantes formées après le traitement fournit une mesure du pouvoir mutagène de la substance d'essai dans ce test système (Zeiger, 2014).

Dans la méthode de pré-incubation, les souches tests sont exposées à la substance chimique pour une courte période (20-30 min) dans un petit volume (0,5 ml) du mélange S9 d'activation enzymatique, avant ensemencement sur milieu d'agar minimale enrichie de glucose (agar GM) et supplémentée avec des traces d'histidine.

***b. Protocol expérimental :***

➤ **Activation et croissance des souches tests :**

- Les souches de génotoxicité TA100, TA98 et TA1535 sont reçus sous forme d'un petit disque contenu dans un flacon stérile. Transférer le disque dans 5 ml de bouillon nutritif.
- Recouvrir le tube avec du papier aluminium pour éviter le contact avec la lumière.
- Incuber la culture en bouillon nutritif à 37 °C pendant une nuit avec agitation.
- Après incubation, ensemercer des boîtes de gélose nutritive et des boîtes d'agar minimal enrichies.
- Incuber les boîtes de gélose nutritive pendant 24 h, et les boîtes d'agar minimale enrichie pendant 48 h.
- Lorsqu'une bonne croissance est observée avec pureté des cultures, inoculer 5 ml de bouillon nutritif avec un petit inoculum à partir de colonies isolées. Après une nuit d'incubation avec agitation à 37 °C, confirmer les génotypes des souches d'essai comme suit :

➤ **Analyse génétique des souches tests : Confirmation des caractères génétiques des souches :**

Les souches de *S. typhimurium* doivent être, préalablement, analysées pour leur intégrité génétique et éventuellement pour vérifier le taux de mutations spontanées.

L'analyse de l'intégrité génétique de chaque souche utilisée doit également être effectuée avant et pendant chaque expérience, afin de s'assurer que chaque souche contient les mutations *uvrB*, et *rfa*, ainsi que le plasmide approprié.

**a. La dépendance à l'histidine et à la biotine (his, bio) :**

La délétion *uvrB*, dans les souches, de *Salmonella* supprime également les gènes de la biotine (bio) de sorte que les souches *uvrB* nécessitent la biotine pour la croissance.

- Ensemencer, par une seule strie, les souches test et une souche sauvage de *Salmonella* (témoin positif) à l'aide d'un écouvillon ou une anse de platine. L'ensemencement se fait sur une boîte de gélose minimal supplémentée de la biotine seule (bio), et sur une boîte additionnée d'un excès de biotine et histidine (bio/his).
- Incubation à 37°C pendant 24 h.
- La croissance doit être observée chez toutes les souches dans les boîtes contenant de l'histidine/biotine, mais pas dans les boîtes contenant uniquement la biotine.

**b. La résistance à l'ampicilline et la sensibilité au Cristal Violet (la mutation *rfa*) :**

La résistance à l'ampicilline confirme la présence du plasmide PKM101 chez les souches TA100 et TA98. La sensibilité au Cristal Violet confirme la présence de la mutation *rfa*.

- Ensemencer par écouvillonnage une boîte de gélose nutritive ou une boîte de Mueller Hinton à partir d'une culture de nuit.
- Placez trois disques de papier buvard stériles dans le centre de chaque compartiment de la boîte.
- Appliquer 10 µl de la solution stérile de cristal violet à 0,1% sur le premier disque.
- Appliquer 10 µl de la solution d'ampicilline à 10 mg/ml sur le deuxième disque.
- Appliquer 10 µl d'eau distillée stérile sur le 3 troisième disque (témoin).
- Incuber à 37°C pendant 24 h.

Les souches TA100 et TA98 résistent à l'ampicilline, la TA1535 montre une sensibilité.

Toutes les souches devraient montrer une zone d'inhibition autour du disque de Cristal Violet.

**c. La sensibilité aux UV :**

Le but de ce test est de vérifier la présence de la mutation *uvrB*.

- Ensemencer sur gélose nutritive en boîte de Petri, par une seule strie, la souche TA100, TA98 et une souche sauvage de *Salmonella* (souche témoin)
- Ensemencer sur gélose nutritive en boîte de Petri, par une seule strie, la souche TA1535 et la souche sauvage de *Salmonella*.
- Couvrir la moitié de chaque boîte par une plaque en verre, puis irradier la boîte par une lampe UV à une distance de 30 mm.



- Irradier pendant 8 secondes la boîte contenant les souches TA100, TA98 et la souche sauvage.
- Irradier pendant 6 secondes la boîte contenant les souches TA1535 et la souche sauvage.
- Incuber à 37°C pendant 24 h.

On note l'absence de croissance dans la partie exposée aux UV des souches tests, contrairement à la souche sauvage de *Salmonella* qui n'a pas été affectée par les UV.

➤ **Préparation du mélange d'activation métabolique S9 :**

La fraction du foie du rat, S9 (MOLTOX, Molecular toxicology, Inc, USA) est utilisée dans le test d'Ames en tant que système d'activation métabolique.

La préparation du mélange d'activation métabolique se fait comme suit (**Mortelmans et Zeiger, 2000**) :

- Mélanger le D-glucose-6-phosphate (423 mg) avec le NADH (124 mg).
- Mélanger 30 ml de la fraction de foie S9 avec le glucose-6-phosphate déshydrogénase (280 U).
- Mélanger les deux solutions précédemment préparées.
- Ajouter la solution FMN (Flavine mononucléotide, 96 mg/7ml).
- Le mélange S9 être conservé dans la glace durant l'expérience.

➤ **La technique de pré-incubation (Figure 20) :**

Avant chaque expérience, les souches TA100, TA98 et TA1535 sont incubées 37 °C pendant une nuit dans un bouillon nutritif.

- Dans des tubes stériles, ajouter dans l'ordre suivant, avec agitation après chaque addition :  
0,05 ml de la solution chimique à tester ; 0,10 ml de la culture de nuit de la souche test à une densité d'environ  $1-2 \times 10^9$  UFC/ ml. Le test est réalisé avec (en ajoutant 0,50 ml du mélange S9) et sans activation métabolique.
- Incuber le mélange à 37°C pendant 20 min, avec agitation douce.
- Ajouter 2 ml agar molle (top agar) fondue et maintenue à 40-43°C dans chaque tube.
- Mélanger le contenu, et versez à la surface des boîtes de gélose minimale. Remuer doucement la boîte pour distribuer la gélose uniformément sur toute sa surface.

Lorsque la gélose a durci (2-3 min), les boîtes sont inversées et placées dans l'étuve à 37°C pendant 48 h.

Deux témoins positifs sont testés de la même façon ; il s'agit du 4NQO, et du sodium azide (Tableau 8).

**Tableau 8 :** Produits chimiques de contrôle positif pour le test d'Ames (sans activation métabolique par le S9). (Mortelmans et Zeiger, 2000).

Souches	Produits chimiques de contrôle (µg/ml)
TA100	Sodium azide (5)
TA98	4-Nitro-o-phenylenediamine (4-NQO) (2,5)
TA1535	Sodium azide (5)

➤ **Lecture et interprétation:**

- Une réponse positive dans l'une des souches d'essai est suffisante pour démontrer qu'une substance est mutagène et qu'il y a une forte probabilité qu'elle soit carcinogène chez les animaux de laboratoire (typiquement des rats et des souris).
- Un test est considéré comme positif s'il y a une réponse liée à la dose dépassant au moins deux fois le contrôle (Tableau 9).
- Pour toutes les souches d'essai avec une faible fréquence de mutants (nombre faible de mutants), cas de la souche TA1535, une dose-réponse conduisant à une multiplication par trois est considérée comme positive (Pillco et Peña, 2014).
- La probabilité que le produit chimique soit un agent cancérigène est la même quelle que soit la souche, ou le nombre de souches d'essai, pour laquelle la substance chimique est mutagène.

**Tableau 9 :** Nombre de révertants spontanés de contrôle pour les souches d'essai de *S. typhimurium* (Pillco et Peña, 2014).

Souches	Nombre de révertants					
	Maron et Ames (1983)		Mortelmans et Zeiger (2000)		Pillco (2011)	
	(-S9)	(+S9)	(-S9)	(+S9)	(-S9)	(+S9)
TA98	30-50	-	20-50	20-50	22-80	22-80
TA100	120-200	-	75-200	75-200	60-220	60-220
TA1535	-	-	5-20	5-20	-	-

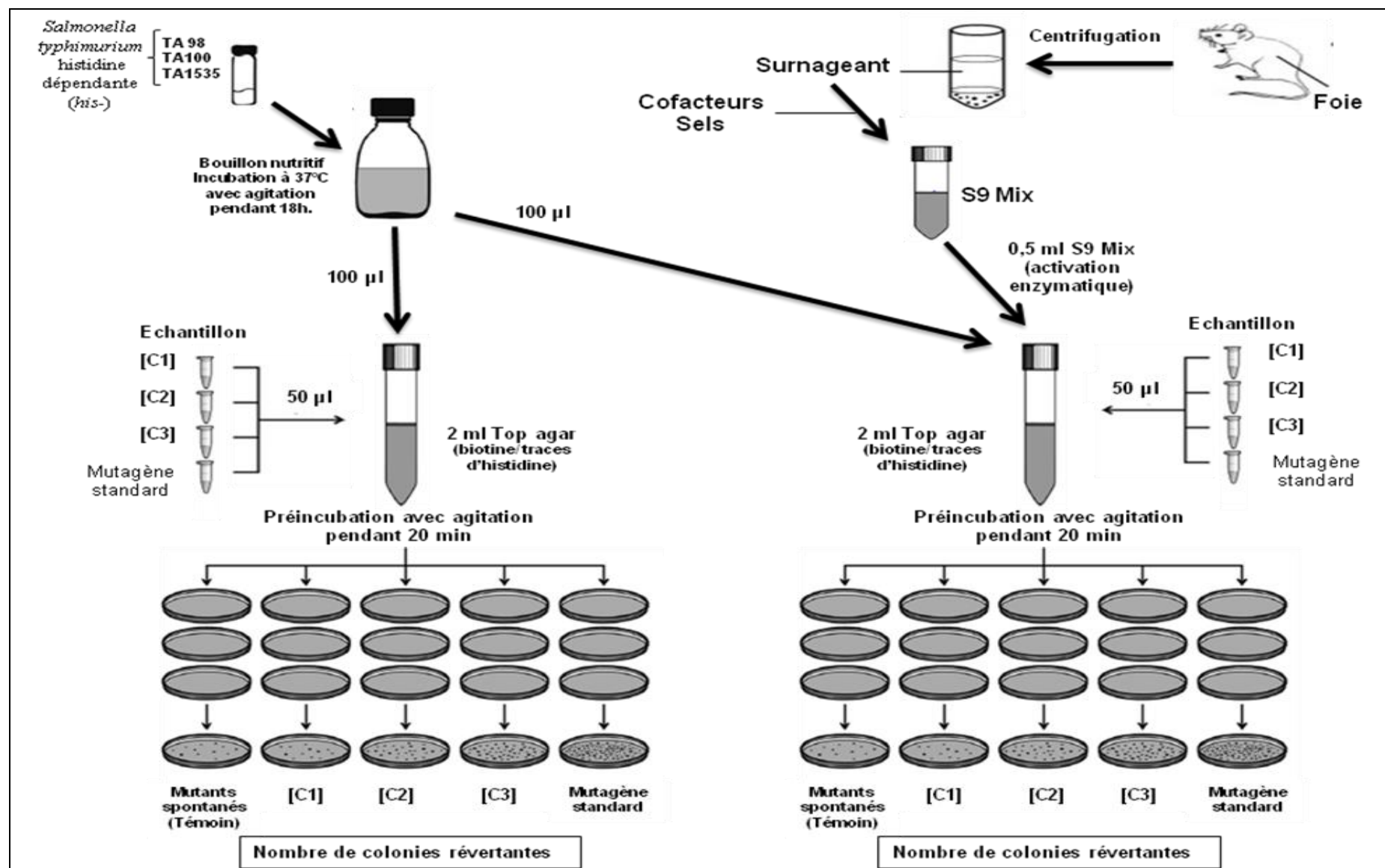


Figure 20 : Protocole expérimental du test d'Ames, méthode de pré-incubation.

### **2.8.2. Le SOS ChromoTest :**

Le SOS Chromotest à été réalisé en utilisant le SOS ChromoTest™ kit, (ebpi : environment bio-detection products inc. CANADA)

#### **a. Principe :**

Le SOS Chromotest est un test colorimétrique, *in vitro*, qui mesure la capacité d'un agent chimique à induire le système de réparation dit SOS, chez *E. coli*, au moyen d'une fusion des gènes du système SOS avec le gène de structure pour la  $\beta$ -galactosidase.

La souche test d'*E. coli* PQ37, utilisée dans le SOS chromotest, porte une fusion *sfiA :: lacZ* et a une délétion de la région *lac*, de sorte que l'activité de la  $\beta$ -galactosidase est strictement dépendante de l'expression *sfiA*. En outre, la souche est génétiquement conçue plus sensibles aux agents génotoxiques: elle est dépourvue de la voie de réparation par excision (*uvrA* de mutation) de telle sorte qu'un certain nombre de lésions n'est pas, ou est lentement réparé ; en plus, la présence d'une mutation (*rfa*) rend la paroi cellulaire plus perméable à un certain nombre de composés. La Synthèse constitutive de la phosphatase alcaline, une enzyme indépendante du système SOS, sert de control de la toxicité (Quillardet et Hofnung, 1985 ; Binet, 2001).

#### **b. Protocole expérimental (Figure 22) :**

##### **➤ Culture de nuit des bactéries :**

- Retirez le flacon du milieu de croissance préalablement conservé au réfrigérateur ainsi que le flacon de bactéries conservé au congélateur.
- En utilisant des conditions aseptiques transférer le milieu de croissance dans le flacon contenant les bactéries.
- Agiter rapidement le flacon pour s'assurer que les bactéries sont bien dispersées dans le milieu de culture. Incuber à 37°C pendant 16 à 18 h.
- Examiner visuellement la turbidité du flacon contenant les bactéries cultivées pendant la nuit. Mesurer la DO à 600 nm par rapport au milieu frais (blanc), ajuster la DO<sub>600</sub> à 0,05.

##### **➤ Le test :**

- Déposer, dans une microplaque de 96 puits, 10  $\mu$ l de la solution saline dans chaque puits.
- Récupérer le témoin 4NQO du congélateur, ainsi que tous les échantillons à tester.
- Déposer 20  $\mu$ l de la solution 4NQO dans le puit 2A ; retirer 10  $\mu$ l du puit 2A et le déposer dans le puits 2B ; bien mélanger et retirer 10  $\mu$ l et les déposer dans le puits 2C. Continuer cette opération jusqu'au puits 2G. Retirer 10  $\mu$ l du puits 2G et s'en débarrasser (le puits 2H est une référence et ne contient aucun des échantillons ou des contrôles).

- Prendre les échantillons à tester (sulfamides **1a-d** et **2a-f**), et les distribuer en double dilution de la même manière que le contrôle (Figure 21).
- Une fois la DO<sub>600</sub> de la culture bactérienne est égale à 0,05, distribuer 100 µl de la culture bactérienne dans chaque puits de la microplaque y compris la rangée H.
- Incuber la microplaque à 37 °C pendant 2 h. Pendant ce temps, les bactéries sont exposées à la matière qui contient les génotoxines présumés.
- Après deux heures d'incubation, rajouter le substrat chromogène.

La procédure à suivre est la vérification quantitative de l'activité simultanée de la β-galactosidase et la phosphatase alcaline (analyse par instrumentation).

(a)

T+	1a	1b	1c	1d	T1			
4-NQO	512 (1a)	512 (1b)	512 (1c)	512 (1d)	4 (1a)	0,5 (1b)	1 (1d)	512 (T)
4-NQO	256 (1a)	256 (1b)	256 (1c)	256 (1d)	2 (1a)	4 (1c)	0,5 (1d)	256 (T)
4-NQO	128 (1a)	128 (1b)	128 (1c)	128 (1d)	1 (1a)	2 (1c)	4 (T)	128 (T)
4-NQO	64 (1a)	64 (1b)	64 (1b)	64 (1b)	0,5 (1a)	1 (1c)	2 (T)	64 (T)
4-NQO	32 (1a)	32 (1b)	32 (1b)	32 (1b)	4 (1b)	0,5 (1c)	1 (T)	32 (T)
4-NQO	16 (1a)	16 (1b)	16 (1b)	16 (1b)	2 (1b)	4 (1d)	0,5 (T)	16 (T)
4-NQO	8 (1a)	8 (1b)	8 (1b)	8 (1b)	1 (1b)	2 (1d)	-	8 (T)
Blanc	T-	T-	T-	T-	T-	T-	T-	T-

(b)

T+	2a	2b	2c	2d	2e	2f	T2				
4-NQO	512 (2a)	512 (2b)	512 (2c)	512 (2d)	512 (2e)	512 (2f)	4 (2a)	0,5 (2b)	1 (2d)	2 (2f)	512 (T2)
4-NQO	256 (2a)	256 (2b)	256 (2c)	256 (2d)	256 (2e)	256 (2f)	2 (2a)	4 (2c)	0,5 (2d)	1 (2f)	256 (T2)
4-NQO	128 (2a)	128 (2b)	128 (2c)	128 (2d)	128 (2e)	128 (2f)	1 (2a)	2 (2c)	4 (2e)	0,5 (2f)	128 (T2)
4-NQO	64 (2a)	64 (2b)	64 (2c)	64 (2d)	64 (2d)	64 (2f)	0,5 (2a)	1 (2c)	2 (2e)	4 (T2)	64 (T2)
4-NQO	32 (2a)	32 (2b)	32 (2c)	32 (2d)	32 (2d)	32 (2f)	4 (2b)	0,5 (2c)	1 (2e)	2 (T2)	32 (T2)
4-NQO	16 (2a)	16 (2b)	16 (2c)	16 (2d)	16 (2d)	16 (2f)	2 (2b)	4 (2d)	0,5 (2e)	1 (T2)	16 (T2)
4-NQO	8 (2a)	8 (2b)	8 (2c)	8 (2d)	8 (2d)	8 (2f)	1 (2b)	2 (2d)	4 (2f)	0,5 (T2)	8 (T2)
Blanc	T-	T-	T-	T-	T-	T-	T-	T-	T-	T-	T-

**Figure 21** : Distribution des différentes concentrations des molécules **1a-d** (a) et **2a-f** (b) ainsi que les deux molécules témoins dans les microplaques du SOS Chromotest.

➤ **Contrôle de l'activité simultanée de la  $\beta$ -galactosidase et de la phosphatase alcaline :**

- Transférer le chromogène bleu sur le substrat de la phosphatase alcaline en poudre ; bien mélanger.
- Ajouter 100  $\mu$ l du mélange obtenu (Chromogène bleu et phosphatase alcaline) dans chaque puits de la plaque.
- Incuber la plaque à 37 °C pendant 60 à 90 min jusqu'à ce qu'une couleur verte apparaisse.
- Si une couleur jaune se développe dans les puits au lieu de la couleur verte, cela signifie la viabilité des bactéries sans développement d'une activité génotoxique.
- Ajouter 50  $\mu$ l de la solution d'arrêt à chaque puits de la plaque.
- Lire la DO à une longueur d'onde de 615 nm afin de mesurer l'activité génotoxique.
- Lire la DO à une longueur d'onde de 405 nm afin de déterminer la viabilité des bactéries.

**c. Calcul du potentiel d'induction SOS (SOSIP) :**

Afin de calculer le SOSIP, on doit tout d'abord tracer et identifier la partie positive linéaire de la courbe (a et b), la DO (mesurée à 615 nm) augmente linéairement avec la concentration du produit testé. Le potentiel d'induction SOS (SOSIP) est la pente de la partie linéaire de la courbe, et est donnée par l'équation suivante:

$$(1) \quad \text{SOSIP} = 10X (\text{OD}_a - \text{OD}_b) / (C_a - C_b)$$

L'expression "(C<sub>a</sub> - C<sub>b</sub>)" dans l'équation (1) permet d'exprimer le résultat en nano-moles par puits de réaction.

L'équation (2) transforme les valeurs de concentration de l'activité des microgrammes en nano-mole :

$$(2) \quad C = \text{CONC} \times \text{VOL} / \text{MW}$$

**CONC** : Concentration du matériel testé en  $\mu$ g/ml,

**VOL** : Volume de la solution de la matière testée dans le puits en microlitres.

**MW** : Poids moléculaire du produit testé.

Le SOSIP calculé pourrait changer de temps en temps en raison du changement des conditions d'incubation, de l'âge de la bactérie etc... ; il serait recommandé de corriger les valeurs en fonction de l'activité d'un standard connu. La procédure est la suivante :

Dans chaque plaque chromotest, le standard 4-NQO fourni est dilué selon les instructions du manuel du Kit. Calculer le SOSIP pour le 4-NQO comme décrit ci-dessus. Diviser le SOSIP

obtenu par 71 pour obtenir un facteur de correction de SOSIP (71 est la valeur publiée par **Quillardet et al., (1982)**, pour le 4-NQO dans la procédure originale du SOS Chromotest).

Diviser toutes les valeurs SOSIP obtenues, pour les molécules testées, par le facteur de correction.

### **2.9. Analyse statistique :**

L'analyse des données a été effectuée en utilisant le logiciel d'analyse des variances (ANOVA) suivie par le test *t Student*.

Tous les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  DS (Déviation standard).

La signification statistique a été considérée à  $p < 0,05$ .

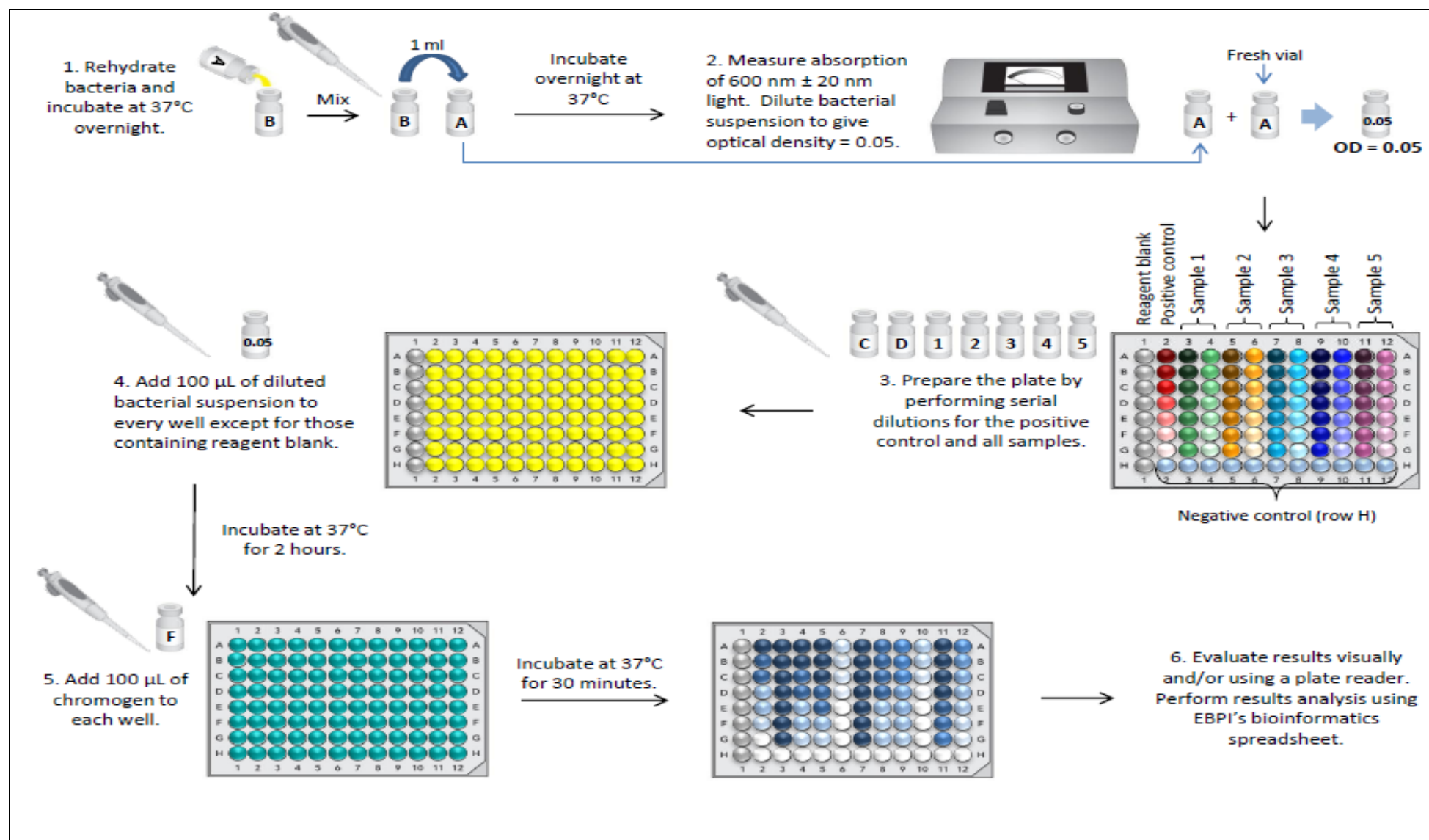


Figure 22 : Protocole expérimental du SOS Chromotest (Web 8).





***RESULTATS***

## 1. Isolement et identification des souches :

### 1.1. Répartition des souches par espèce :

Dans notre étude les espèces isolées sont représentées principalement par *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli* et *K. pneumoniae* avec les pourcentages respectifs : 25,33 %, 15,20%, 12,16% et 11,78%. Les autres espèces sont réparties selon des pourcentages relativement semblables (Tableau 10, Figure 23).

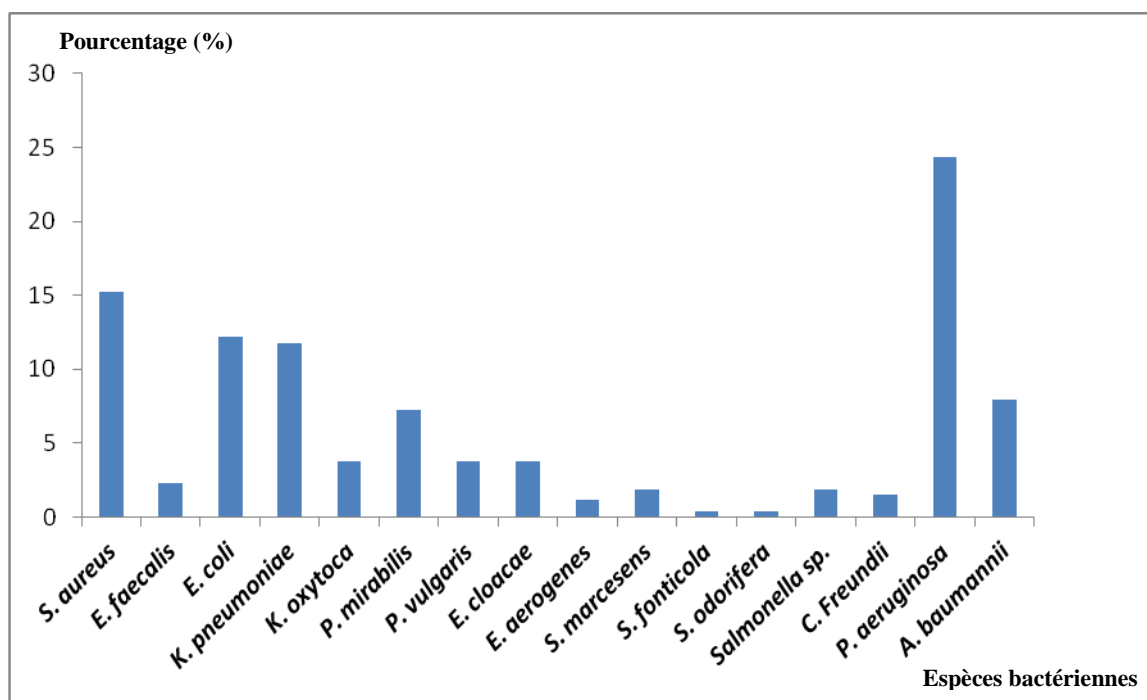


Figure 23 : Répartition des souches bactériennes isolées selon les espèces.

### 1.2. Répartition des souches selon l'établissement d'isolement :

Afin de différencier les souches nosocomiales des souches communautaires, nous avons classé chaque souche selon l'origine de l'établissement où le prélèvement a été récupéré (Tableau 10).

Selon les résultats obtenus, 46,18% soit un total de 121 souches ont été isolées chez des patients hospitalisés au niveau des CHU Annaba (infections nosocomiales), et 53,81% soit un total de 141 souches ont été isolées au niveau des laboratoires privés d'analyses médicales de la ville d'Annaba (infections communautaires).

**Tableau 10** : Répartition des souches selon l'établissement d'isolement.

Souches bactériennes	CHU		Laboratoires privés		Nombre de souches	Pourcentage de souches (%)
	Nombre	%	Nombre	%		
<i>S. aureus</i>	26	65	14	35	40	15,2
<i>E. faecalis</i>	3	50	3	50	6	2,28
<i>E. coli</i>	07	21,87	25	78,12	32	12,16
<i>K. pneumoniae</i>	15	48,38	16	51,61	31	11,78
<i>K. oxytoca</i>	3	30	7	70	10	3,8
<i>P. mirabilis</i>	10	52,63	9	47,36	19	7,22
<i>P. vulgaris</i>	2	20	8	80	10	3,8
<i>E. cloacae</i>	3	30	7	70	10	3,8
<i>E. aerogenes</i>	0	0	3	100	3	1,14
<i>S. marcescens</i>	0	0	5	100	5	1,9
<i>S. fonticola</i>	0	0	1	100	1	0,38
<i>S. odorifera</i>	0	0	1	100	1	0,38
<i>Salmonella sp.</i>	5	100	0	0	5	1,9
<i>C. freundii</i>	2	50	2	50	4	1,52
<i>P. aeruginosa</i>	34	53,12	30	46,87	64	25,33
<i>A. baumannii</i>	11	52,38	10	47,61	21	7,98
<b>Total</b>	<b>121</b>	<b>/</b>	<b>141</b>	<b>/</b>	<b>262</b>	<b>100</b>

### 1.3. Répartition des souches selon l'origine du prélèvement :

Pour les prélèvements d'origine hospitalière, la plupart des souches ont été isolées à partir de pus (lésions cutanées et pieds diabétiques) (32,23%), et de prélèvements distaux protégés (24,79%) (Figure 24).

Les souches d'origine communautaire ont été majoritairement isolées à partir des urines (73,23%), et de prélèvements de pus (21,83%), (Figure 25).

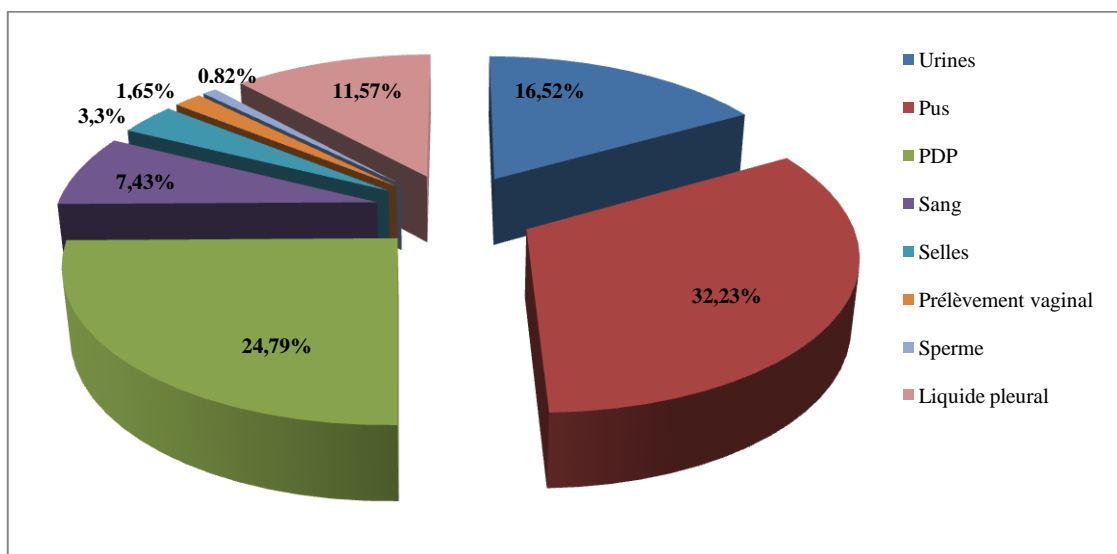


Figure 24 : Répartition des souches nosocomiales selon le type de prélèvement.

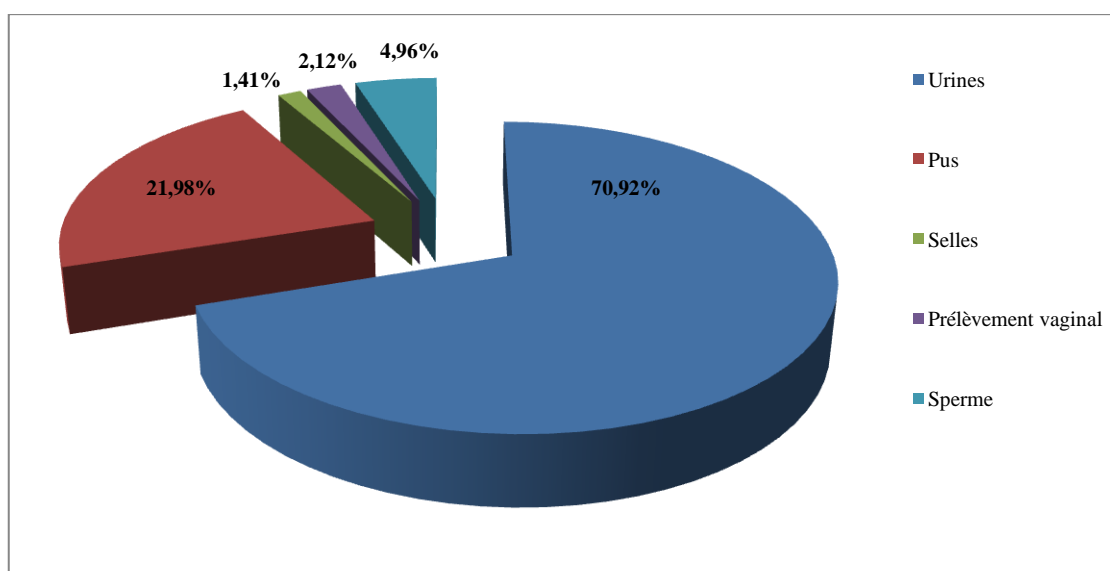
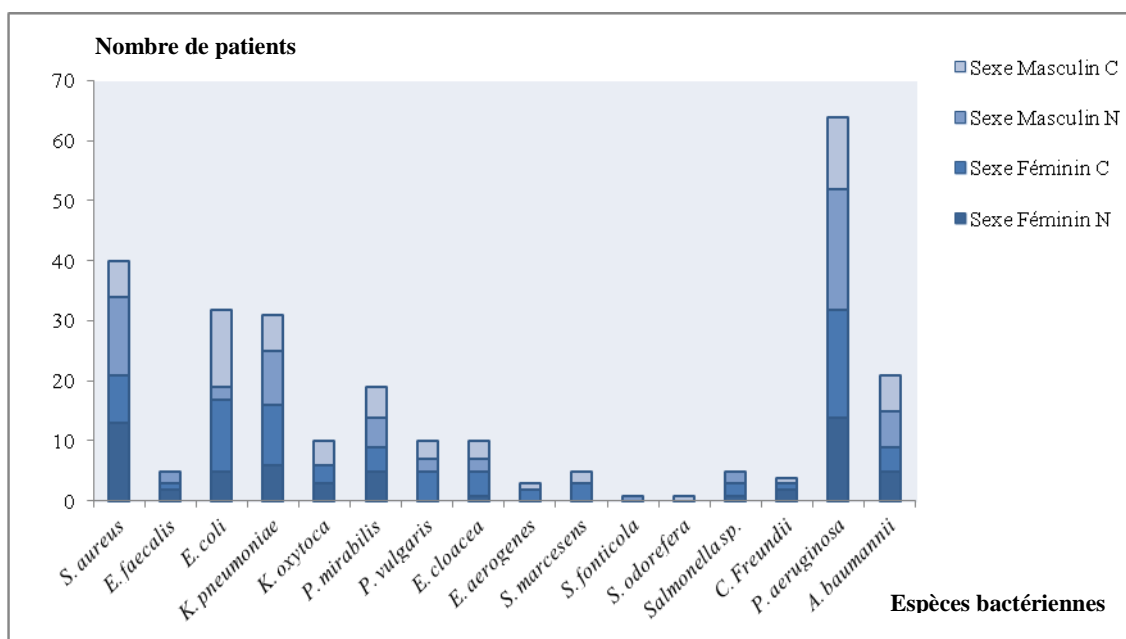


Figure 25 : Répartition des souches communautaires selon le type de prélèvement.

#### 1.4. Répartition des espèces bactériennes selon le sexe :

La répartition, selon le sexe, des souches isolées faisant l'objet de cette étude montre un sexe ratio Hommes/Femmes de 0,95 (prédominance féminine).

Pour les infections nosocomiales, le sexe ratio Hommes/Femmes est de 1,10 (prédominance masculine), alors que pour les infections communautaires, le sexe ratio Hommes/Femmes est de 0,84 (prédominance féminine) (Figure 26).



N : Nosocomiale.  
C : Communautaire.

**Figure 26 :** Répartition des espèces bactériennes isolées selon le sexe des patients.

### 1.5. Répartition des souches selon l'âge des patients :

L'âge des patients varie entre 6 mois et 88 ans. Les tranches d'âge les plus exposées aux infections bactériennes sont situées entre 20 et 60 ans. On note également un nombre important de patients dépassant les 60 ans ; il s'agit d'une population dont le système immunitaire est affaibli.

Dans le cas des patients hospitalisés, l'âge varie entre 6 mois (liquide pleural) et 88 ans (urines). Pour les patients atteints d'infections communautaires, l'âge varie entre 9 mois et 88 ans (urines) (Tableau 11).

**Tableau 11 : Répartition des espèces bactériennes selon l'âge des patients.**

Intervalles d'âge	< 1 ans		1-5		6-10		11-20		21-30		31-40		41-50		51-60		> 60	
	N	C	N	C	N	C	N	C	N	C	N	C	N	C	N	C	N	C
<i>S. aureus</i>	/	/	2	/	/	/	4	/	1	3	3	5	4	1	5	2	7	3
<i>E. faecalis</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	3	3	/	/	/	/	/
<i>E. coli</i>	/	1	/	1	/	1	/	2	1	4	2	4	1	3	1	3	2	6
<i>K. pneumoniae</i>	/	/	/	/	/	/	/	2	3	4	2	3	1	3	2	1	7	3
<i>K. oxytoca</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	2	1	/	/	2	1	2	1	1
<i>P. mirabilis</i>	/	/	/	/	/	2	1	2	2	1	1	1	2	2	2	/	2	1
<i>P. vulgaris</i>	/	/	/	/	/	1	/	1	/	2	/	3	/	/	/	1	2	/
<i>E. cloacae</i>	/	/	2	/	/	/	/	1	/	1	/	3	/	2	/	/	1	/
<i>E. aerogenes.</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	1	/	1	/	/	/	1	/	/
<i>S. marcescens</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	2	/	/	/	1	/	2
<i>S. fonticola</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	1	/	/	/	/
<i>S. odorifera</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	1
<i>Salmonella sp.</i>	/	/	/	2	/	/	1	/	1	/	/	/	1	/	/	/	/	/
<i>C. freundii</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	1	2	1
<i>P. aeruginosa</i>	1	/	1	/	2	/	4	2	2	8	/	5	2	5	8	3	14	7
<i>A. baumannii</i>	/	/	1	/	1	/	1	1	1	2	1	3	1	2	2	1	3	1

N : Nosocomiale.  
C : Communautaire.

## 2. Antibiogramme standard:

### 2.1. Antibiogramme standard des souches à Gram positif :

#### 2.1.1. Antibiogramme standard des souches de *S. aureus* :

Les souches de *S. aureus* montrent une grande résistance vis-à-vis de la majorité des antibiotiques testés à savoir les  $\beta$ -lactamines : la pénicilline (97,5%), l'oxacilline (67,5%) et la céfoxitine (70%) (Photo 1).

La résistance à la céfoxitine a été confirmée par le test de screening à l'oxacilline (Photo 2). Ainsi, 28 souches de *S. aureus* dites MRSA (*S. aureus* Résistant à la Méricilline) ont été isolées ; elles sont constituées de 22 souches nosocomiales (13 souches isolées à partir de pus, 2 souches isolées à partir des urines, 2 souches isolées à partir de PDP et 5 souches isolées à partir de sang), et de 6 souches communautaires (4 souches isolées à partir des urines et 2 souches isolées à partir de pus).

Les souches de *S. aureus* qui se sont montrées les plus résistantes sont des souches nosocomiales ; en plus de leur résistance aux  $\beta$ -lactamines elles résistent aux aminosides : la

streptomycine (100%), la kanamycine (90%), la tobramycine (75%), l'amikacine (62,5%), la gentamicine (57,5%), la clindamycine (30%), la lincomycine (55%), la vancomycine (17,5%), la teicoplanine (30%) et au triméthoprim/ sulfaméthoxazole (35%). Néanmoins, quelques souches communautaires ont développé des résistances tout comme pour le cas de la pénicilline (30%), la kanamycine (30%), la streptomycine (100%), le sulfamide SSS (27,5 %), la rifampicine (32,5%) et l'acide fusidique (27,5 %).

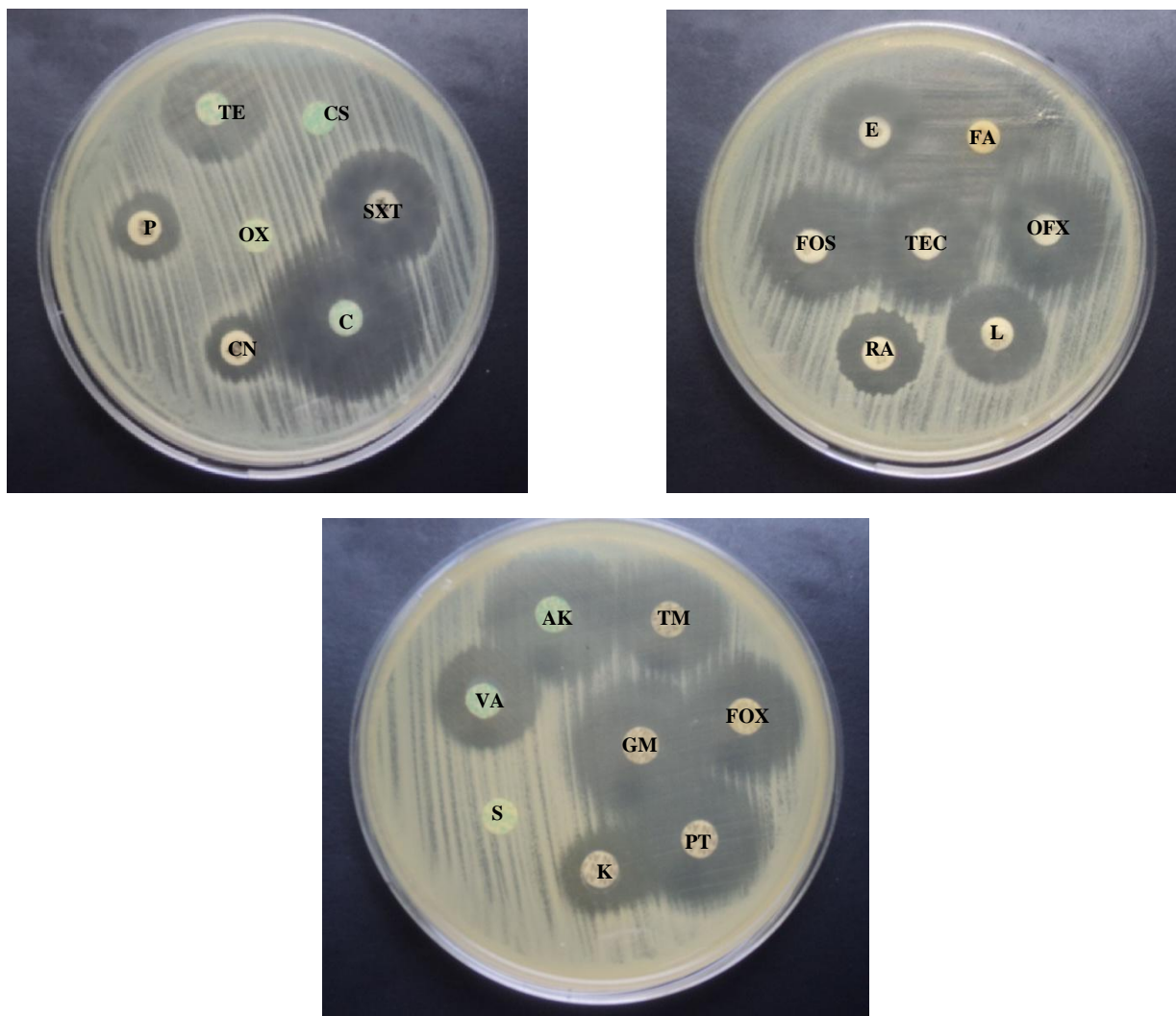
Les souches résistantes à la vancomycine sont des souches nosocomiales isolées à partir de pus (3 souches), PDP (2 souches) et sang (2 souches).

Toujours dans le cas des souches nosocomiales, la rifampicine, les sulfamides (SSS), l'acide fusidique et la tétracycline présentent, respectivement, les pourcentages de résistance suivants : 97,5% 87,5%, 82,5% et 80%.

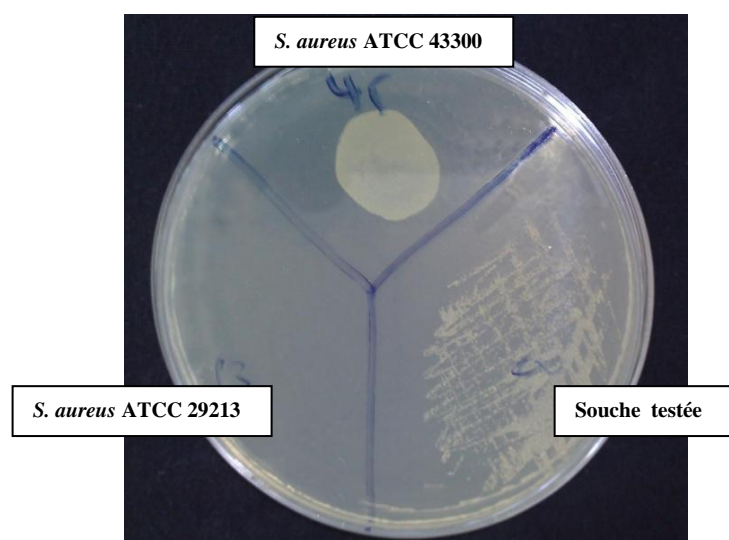
Néanmoins, on note une bonne sensibilité vis-à-vis de la vancomycine (82,5%), la clindamycine (70%), la teicoplanine (70%) et le triméthoprim/sulfaméthoxazole (65%) (Tableau 12).

**Tableau 12 :** Résultats de l'antibiogramme standard des souches de *S. aureus*.

Familles		Antibiotiques	<i>S. aureus</i> (%)
β-lactamines	Céphalosporine de 2ème génération	P	97,5
		OX	67,5
		FOX	70
Aminosides		TM	75
		AK	62,5
		GM	57,5
		K	90
		S	100
Quinolones		OFX	62,5
Macrolides		E	52,5
		CN	30
		L	55
		PT	60
Glycopeptides		VA	17,5
		TEC	30
Sulfamides		SXT	35
		SSS	87,5
Polymyxines		CS	60
Fosfomycines		FOS	52,5
Phénicols		C	52,5
Tétracyclines		TE	80
Autres		RA	97,5
		FA	82,5



**Photo1 :** Antibiogramme standard d'une souche nosocomiale de *S. aureus*.



**Photo 2 :** Screening test d'une souche de *S. aureus* résistante à la Méricilline (MRSA).



La présence d'une culture bactérienne de plus d'une colonie dans la zone où la souche clinique a été ensemencée, comparée au témoin positif *S. aureus* ATCC 43300 résistante à l'oxacilline, montre que cette dernière est également résistante à l'oxacilline et elle est dite SARM.

**2.1.2. Antibiogramme standard des souches d'*E. faecalis* :**

Les souches d'*E. faecalis* montrent une résistance vis-à-vis de la plupart des antibiotiques testés. Cette résistance est importante vis-à-vis de l'erythromycine (66,66%) et la tétracycline (83,33%). On note néanmoins une sensibilité de 100% vis-à-vis de la pénicilline, l'amoxicilline, amoxicilline/acide clavulanique, la ciprofloxacine, le chloramphénicol et le nitrofurantoïne (Tableau 13).

Les souches d'*E. faecalis* nosocomiales ou communautaires, isolées à partir des prélèvements urinaires, montrent des résistances similaires.

Une souche nosocomiale a présenté une résistance à l'imipénème et à la vancomycine.

**Tableau 13 :** Résultats de l'antibiogramme standard des souches d'*E. faecalis*.

Familles		Antibiotiques	<i>E. faecalis</i> (%)
β-lactamines		P	0
		OX	100
		AM	0
	Aminopénicillines+ inhibiteur de β-lactamase	AMC	0
	Céphalosporine de 2ème génération	FOX	100
Carbapénèmes		IMP	16,66
Aminosides		TM	100
		AK	100
		GM	100
		K	100
		S	100
Quinolones		OFX	100
		CIP	0
Macrolides		E	66,66
		CN	100
		L	100
Glycopeptides		VA	16,66
Sulfamides		SXT	100
		SSS	100
Phénicols		C	0
Tétracyclines		TE	83,33
Furanes (nitrofurantoïne)		F	0
Autres		RA	33,33

## 2.2. Antibiogramme standard des souches à Gram négatif :

### 2.2.1. Antibiogramme standard des souches à Gram négatif fermentaires :

Les résultats de l'antibiogramme d'*E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *P. mirabilis* et *P. vulgaris* sont présentés dans le Tableau 14.

Les souches d'*E. coli* montrent une résistance importante vis-à-vis de la plupart des antibiotiques testés avec des pourcentages allant de 50% (céfotaxime) à 100% (céfalotine, amoxicilline/acide clavulanique, ticarcilline et tobramycine).

Certaines souches ont également montré une résistance au reste des antibiotiques tout comme pour le cas des Céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération, où les souches communautaires isolées à partir des urines ont été les plus résistantes pour la ceftazidime, la céfotaxime et la céftriaxone avec des pourcentages respectifs de 40,62 %, 50 % et 31,25 %.

Néanmoins, ces souches restent sensibles à l'imipénème, l'amikacine, la gentamycine, l'ofloxacine la fosfomycine et le chloramphénicol (Photo 3).

Les 3 souches résistantes à l'ofloxacine sont nosocomiales et sont isolées à partir de PDP (2 souches) et de sperme (1 souche). Les 10 souches résistantes à l'acide nalidixique sont isolées à partir des urines (2 souches nosocomiales et 6 souches communautaires), et à partir de PDP (2 souches nosocomiales).

Les souches de *K. pneumoniae* et *K. oxytoca* présentent des pourcentages de résistance similaires pour tous les antibiotiques testés. En effet, on note pour les deux souches une résistance de 100% pour la famille des  $\beta$ -lactamines (céftazidime, céfotaxime, céfalotine et amoxicilline/acide clavulanique), ainsi que pour la ticarcilline, tobramycine, gentamycine, sulfamides et tetracycline.

Toute fois, les souches de *K. oxytoca* présentent 100% de résistance à la colistine, alors que les souches de *K. pneumoniae* présentent 70,96% de résistance (Photo 4).

Concernant *K. pneumoniae*, parmi les 12 souches résistantes au céftriaxone, 2 souches ont été isolées à partir des urines d'origine communautaire, 6 souches à partir de pus nosocomial et 4 souches à partir de PDP nosocomials. Les souches résistantes à la Céfoxitine sont isolées à partir du sang (nosocomial).

Les deux souches de *K. oxytoca* isolées à partir de pus nosocomial sont résistantes au triméthoprime/sulfaméthoxazole.

*P. mirabilis* et *P. vulgaris* sont sensibles à la majorité des antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactamines excepté l'amoxicilline/acide clavulanique qui présente 100% de résistance.

En ce qui concerne les souches de *P. mirabilis* on note une résistance pour l'ofloxacin (63,15%), l'acide nalidixique (73,68%) et le triméthoprime/sulfaméthoxazole (84,21%). Ces pourcentages sont légèrement supérieurs à ceux obtenus pour les souches de *P. vulgaris* et sont respectivement de : 50%, 70% et 80%.

Les souches de *P. mirabilis* résistantes à l'ofloxacin et à l'acide nalidixique sont respectivement isolées à partir des urines communautaires, de pus et de prélèvement vaginal nosocomial.

Les souches de *P. mirabilis* résistantes au triméthoprime/sulfaméthoxazole sont isolées à partir des urines (6 souches) et de pus (3 souches) communautaires ; 4 souches sont isolées à partir de pus, 1 souche isolée à partir de PDP et 2 souches isolées à partir de prélèvements vaginaux nosocomials.

Les souches de *P. vulgaris* résistantes à l'ofloxacin et à l'acide nalidixique ainsi que les souches sensibles au triméthoprime/sulfaméthoxazole sont isolées à partir des urines communautaires.

**Tableau 14 :** Antibiogramme standard des souches d'*E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *P. mirabilis* et *P. vulgaris*.

Familles		Antibiotiques	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. vulgaris</i>
β-lactamines	Céphalosporine de 3 <sup>ème</sup> génération	CAZ	40,62	100	100	0	0
		CTX	50	100	100	0	0
		CRO	31,25	38,7	50	0	0
	Céphalosporine de 2 <sup>ème</sup> génération	CF	100	100	100	0	0
		FOX	0	9,67	0	0	0
Aminopénicillines + inhibiteur De β-lactamase		AMC	100	100	100	100	100
Monobactames		ATM	70,87	93,54	100	100	100
Carbapénèmes		IMP	0	0	0	0	0
Carboxypenicilline		TIC	100	100	100	100	100
Aminosides		TM	100	100	100	0	0
		AK	0	77,41	80	0	0
		GM	0	100	100	0	0
Quinolones		OFX	9,37	41,94	50	63,15	50
		NA	31,25	70,96	80	73,68	70
		CIP	21,87	58,06	60	0	0
Sulfamides		SXT	84,37	67,74	80	84,21	80
		SSS	90,62	100	100	100	100
Polymyxines		CS	81,25	70,96	100	100	100
Les fosfomycines		FOS	0	0	0	0	0
Phénicols		C	0	0	0	0	0
Tétracycline		TE	59,37	100	100	100	100

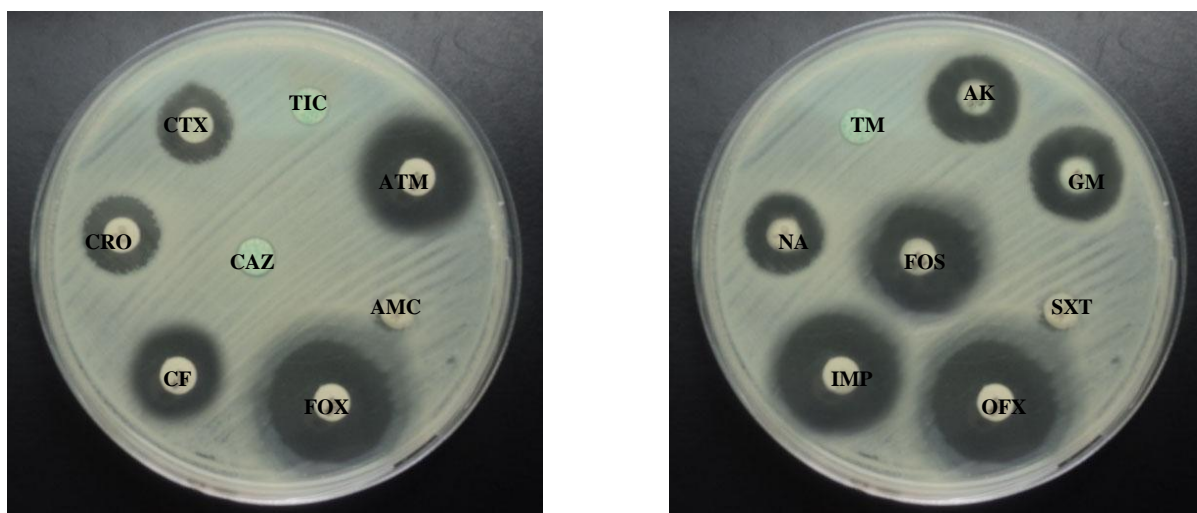


Photo 3 : Antibiogramme standard d'une souche communautaire d'*E. coli*.

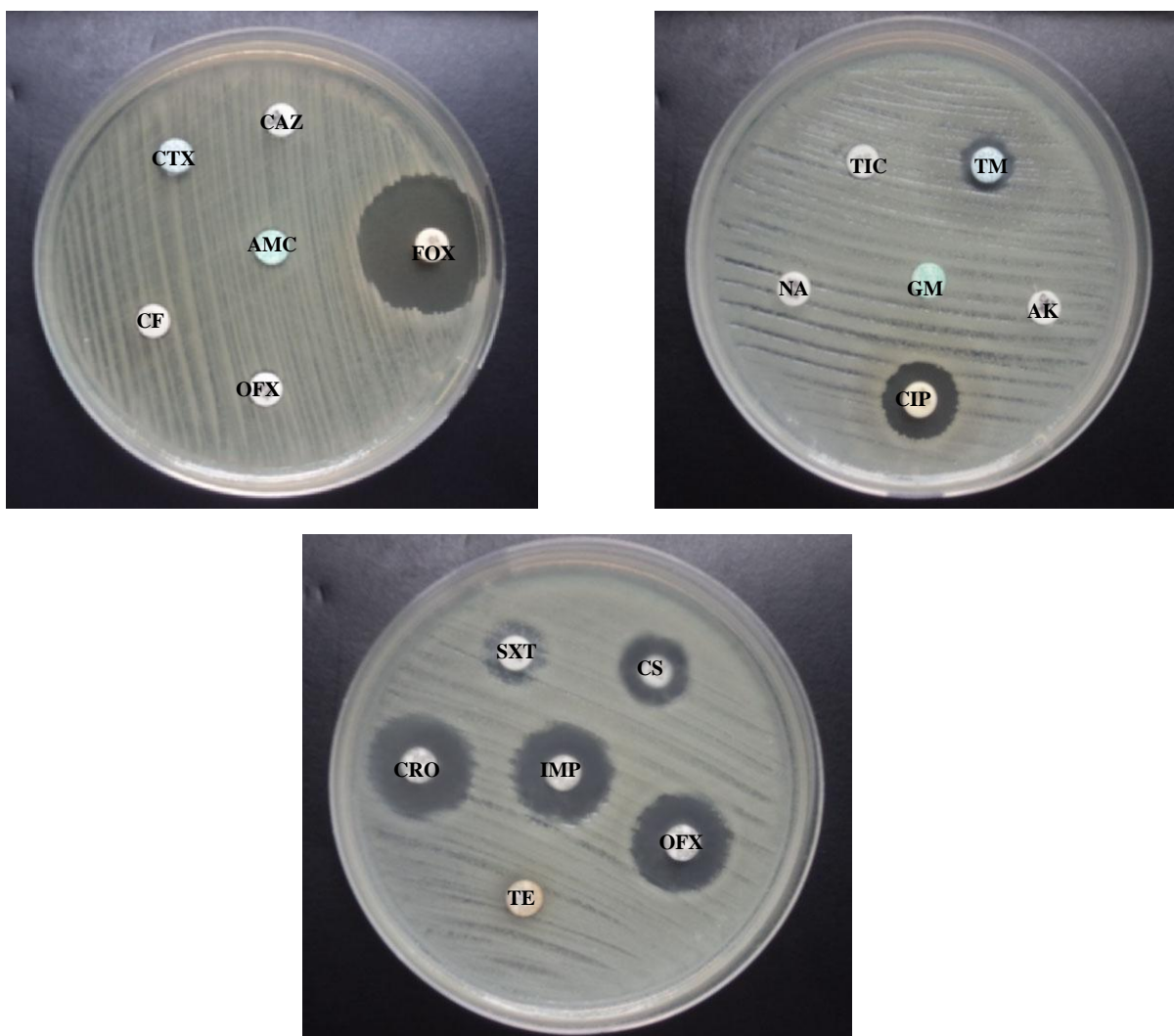


Photo 4 : Antibiogramme standard d'une souche nosocomiale de *K. pneumoniae*.

Les souches d'*E. cloacae* montrent une forte à moyenne résistance à la famille des  $\beta$ -lactamines, elle est de 100% pour la céfalotine et la céfoxitine. Cette résistance est de 100% pour l'aztréonam, la ticarcilline, et les sulfamides (SSS). Elle reste importante pour les autres antibiotiques (Tableau 15).

Toutes les souches isolées à partir des urines nosocomiales ou communautaires sont résistantes aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération (céftazidime, céfotaxime et céftriaxone) ainsi qu'à l'amoxicilline/acide clavulanique, en plus d'une souche isolée à partir des selles. Ces souches résistent également à la tobramycine et à la gentamycine. Les souches résistantes à l'acide nalidixique (40%) sont isolées à partir de sperme (3 souches communautaires) et des selles (1 souche nosocomiale). Les 3 souches résistantes à la colistine sont isolées à partir de sperme communautaire. La souche isolée à partir des selles ainsi que deux souches isolées à partir des urines communautaires sont sensibles au triméthoprim/sulfaméthoxazole.

Néanmoins, les souches d'*E. cloacae* restent sensibles à 100% à l'imipénème, l'amikacine, la ciprofloxacine et la fosfomycine.

Les souches d'*E. aerogenes* ont une résistance de 100% à plusieurs antibiotiques, néanmoins elles restent sensibles à la céftriaxone, l'imipénème, la tobramycine, l'amikacine, la gentamycine de la famille des aminosides, l'acide nalidixique et à la ciprofloxacine de la famille des quinolones, mais aussi à la colistine, la fosfomycine, le chloramphénicol et à la tétracycline (Tableau 15).

Concernant la famille des  $\beta$ -lactamines, les souches de *S. marcescens*, *S. fonticola* et *S. odorifera* sont 100% sensibles à la céftazidime, la céfotaxime, la céftriaxone et la céfoxitine (Tableau 16).

Les souches de *S. odorifera* sont également sensibles à l'amoxicilline/acide clavulanique (100%), contrairement aux souches de *S. marcescens* et *S. fonticola* qui sont résistantes avec les pourcentages respectifs de 50% et 100% au même antibiotique.

Les trois espèces bactériennes sont résistantes aux mêmes antibiotiques, excepté *S. marcescens* qui résiste également à la tobramycine (50%), sulfamides (50%) et la colistine (100%).

Les souches de *Salmonella sp.* résistent à la majorité des antibiotiques testés mis à part l'imipénème, la gentamycine, le triméthoprim/sulfaméthoxazole, le sulfamide (SSS), le chloramphénicol et la tétracycline avec 100% de sensibilité (Tableau 16).

La souche qui a résisté à la céfoxitine et à la fosfomycine a été isolée à partir des selles nosocomiales. Les 2 souches résistantes à la tobramycine sont isolées à partir des selles nosocomiales (1 souche), et de selles communautaires (1 souche).

**Tableau 15 :** Antibiogramme standard des souches d'*E. cloacae* et *E. aerogenes*.

Familles		Antibiotiques	<i>E. cloacae</i>	<i>E. aerogenes</i>
β-lactamines	Céphalosporine de 3ème génération	CAZ	60	100
		CTX	70	100
		CRO	50	0
	Céphalosporine de 2ème génération	CF	100	100
		FOX	100	100
Aminopénicillines+ inhibiteur de β-lactamase		AMC	60	100
Monobactames		ATM	100	100
Carbapénèmes		IMP	0	0
Carboxpénicilline		TIC	100	100
Aminosides		TM	60	0
		AK	0	0
		GM	70	0
Quinolones		OFX	70	100
		NA	40	0
		CIP	0	0
Sulfamides		SXT	70	100
		SSS	100	100
Polymyxines		CS	30	0
Les fosfomycines		FOS	0	0
Phénicol		C	70	0
Tétracycline		TE	70	0

Les quatre souches de *C. freundii* ont également une forte résistance aux antibiotiques testés. Néanmoins, elles sont 100% sensibles à la ceftazidime, l'imipénème, la gentamycine, le triméthoprim/sulfaméthoxazole, la colistine, le chloramphénicol et à la tétracycline (Tableau 16).

Les deux souches de *C. freundii* résistantes à la céfotaxime, l'amoxicilline/acide clavulanique et à la fosfomycine, sont isolées à partir des urines nosocomiales. Une souche communautaire isolée à partir des urines a montré également une résistance vis-à-vis de ces antibiotiques.

**Tableau 16 :** Antibiogramme standard des souches de *S. marcescens*, *S. fonticola*, *S. odorifera*, *Salmonella sp.* et *C. freundii*.

Familles		Antibiotiques	<i>S. marcescens</i>	<i>S. fonticola</i>	<i>S. odorifera</i>	<i>Salmonella sp.</i>	<i>C. freundii</i>
β-lactamines	Céphalosporine de 3ème génération	CAZ	0	0	0	100	0
		CTX	0	0	0	100	75
		CRO	0	0	0	100	100
	Céphalosporine de 2ème génération	CF	100	100	100	100	100
		FOX	0	0	0	80	25
Aminopénicillines + inhibiteur de β-lactamase		AMC	60	100	0	100	50
Monobactames		ATM	100	100	100	100	100
Carbapénèmes		IMP	0	0	0	0	0
Carboxypenicilline		TIC	100	100	100	100	100
Aminosides		TM	60	0	0	60	100
		AK	100	100	100	100	100
		GM	0	0	0	0	0
Quinolones		OFX	100	100	100	100	100
		NA	100	100	100	100	100
		CIP	100	100	100	100	100
Sulfamides		SXT	0	0	0	0	0
		SSS	60	0	0	0	100
Polymyxines		CS	100	0	0	100	0
Les fosfomycines		FOS	0	0	0	80	75
Phénicolés		C	0	0	0	0	0
Tétracycline		TE	0	0	0	0	0

### 2.2.2. Antibiogramme standard des souches à Gram négatif non fermentaires :

*P. aeruginosa* et *A. baumannii* se classent parmi les souches les plus résistantes. En effet, on remarque que les souches de *P. aeruginosa* résistent à une multitude d'antibiotiques et avec des pourcentages élevés. Toute fois, elles restent sensibles à l'amikacine (92,19%), la gentamicine (62,5%), la ciprofloxacine (90,63%) et à la colistine (92,18%) (Tableau 17) (Photo 5).

Les souches résistantes à la gentamicine, l'amikacine et à la ciprofloxacine et à la colistine sont isolées à partir de pus et de liquide pleural d'origine nosocomiale ; en plus des souches communautaires isolées à partir de pus.

Les souches de *P. aeruginosa* qui ont montré une résistance à l'aztréonam, l'imipénème, la ticarcilline, la céftazidime, la ticarcilline/acide clavulanique, la pipéracilline, la tobramycine, la fosfomycine et à la tétracycline sont isolées à partir des urines

(6 souches nosocomiales et 10 souches communautaires), de pus (9 souches nosocomiales et 2 souches communautaires), de liquide pleural (3 souches nosocomiales), le reste des souches résistantes est isolée à partir de PDP nosocomials.

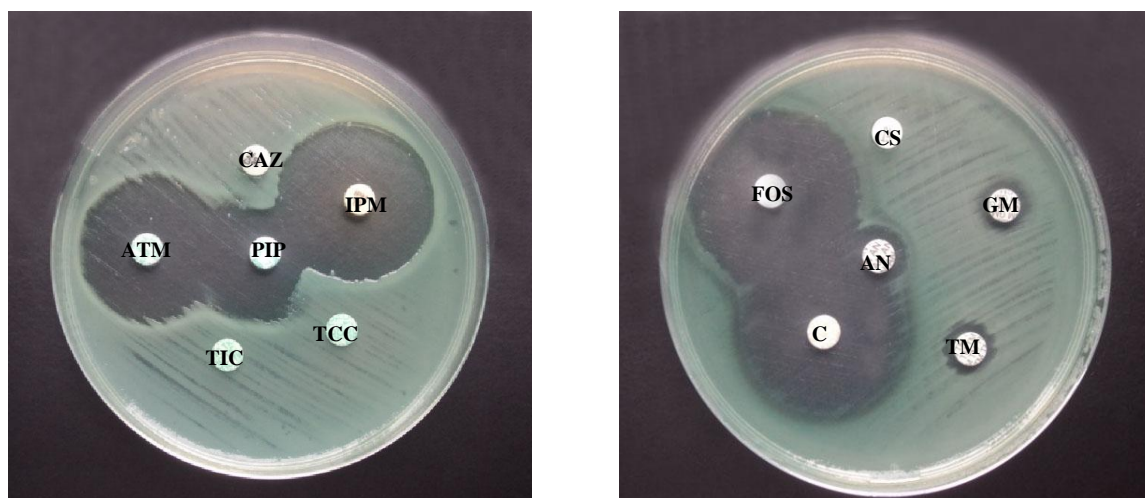
Les souches d'*A. baumannii*, se montrent encore plus résistantes vis-à-vis des antibiotiques. Néanmoins, elles restent sensibles à la colistine (90,48%) et à la fosfomycine (100%) (Tableau 17).

Les souches résistantes d'*A. baumannii* (l'imipénème, l'aztréonam, la pipéracilline, la tobramycine, l'amikacine, la gentamicine, la ciprofloxacine et le triméthoprim/sulfaméthoxazole) sont isolées à partir de pus, PDP, sperme et liquide pleural nosocomials (15 souches). Quelques souches isolées à partir des urines communautaires ont également montrées une résistance à l'aztréonam, la pipéracilline et la gentamicine. Les deux souches résistantes à la colistine sont isolées à partir de sperme communautaire.

**Tableau 17 :** Antibiogramme standard des souches de *P. aeruginosa* et *A. baumannii*.

Familles		Antibiotiques	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. baumannii</i>
<b>β-lactamines</b>	<b>Céphalosporine de 3ème génération</b>	CAZ	64,06	100
	<b>Carbapénèmes</b>	IMP	46,87	66,66
	<b>Monobactames</b>	ATM	42,18	85,71
	<b>Carboxpenicilline</b>	TIC	68,75	100
		TCC	65,62	100
	<b>Uréidopénicilline</b>	PIP	60,93	90,47
<b>Aminosides</b>		TM	71,87	61,90
		AK	7,81	52,38
		GM	37,5	76,19
		CIP	9,37	61,90
<b>Sulfamides</b>		SXT	92,18	71,42
		SSS	100	100
<b>Polymixines</b>		CS	7,81	9,52
<b>Fosfomycines</b>		FOS	59,37	0
<b>Phénicol</b>		C	0	0
<b>Tetracyclines</b>		TE	68,75	100





**Photo 5 :** Antibiogramme standard d'une souche nosocomiale de *P. aeruginosa*.

### Conclusion 1 :

La résistance bactérienne aux antibiotiques standards, utilisés en thérapie humaine, prend une grande ampleur et touche la majorité des espèces bactériennes pathogènes aussi bien les souches nosocomiales que les souches communautaires, ce qui a été démontré dans cette étude.

En effet, les bactéries à Gram positif telle que *S. aureus* montrent une grande résistance vis-à-vis de la majorité des antibiotiques testés à savoir les  $\beta$ -lactamines : la pénicilline (97,5%), l'oxacilline (67,5%) et la céfoxitine (70%) ; parmi les 40 souches isolées, 28 souches étaient des SARM. Les souches d'*E. faecalis* montrent également une résistance à la plupart des antibiotiques testés.

En ce qui concerne les bactéries à Gram négatif, un taux de résistance important a été noté. Pour les céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération, elle varie de 50% pour les souches d'*E. coli* à 100% pour *K. pneumoniae* et *K. oxytoca*. Des pourcentages élevés sont obtenus avec la plupart des souches et avec la majorité des antibiotiques.

*P. aeruginosa* et *A. baumannii* se classent parmi les souches les plus résistantes. En effet, *P. aeruginosa* résistent à une multitude d'antibiotiques. Quant aux souches d'*A. baumannii*, elles se montrent encore plus résistantes à la majorité des antibiotiques testés.

La conséquence majeure de l'émergence de cette résistance est la diminution du nombre d'antibiotiques bioactifs, et donc la diminution des probabilités thérapeutiques. Comment peut-on pallier à ce déficit de molécules antibactériennes ? Quel est l'apport, l'importance et l'efficacité des molécules de synthèse, tels que les sulfamides, pour faire face aux problèmes de la résistance antibactérienne ?

### 3. Evaluation de l'activité antibactérienne de deux séries de sulfamides néosynthétisés :

#### 3.1. Détermination des zones d'inhibition et des CMI des deux séries de sulfamides 1a-d et 2a-f vis-à-vis des souches de références:

Les résultats de l'évaluation de l'activité antibactérienne des deux nouvelles séries de sulfamides **1a-d** et **2a-f** vis-à-vis des souches de références, concernant les zones d'inhibition ainsi que les CMI sont exprimés dans les Tableaux 18 et 19.

##### a) La série de sulfamide 1a-d :

Les résultats du Tableau 18 montrent que les diamètres des zones d'inhibition de la série de sulfamides **1a-d** vis-à-vis des souches de références, varient entre 15 et 34 mm.

La molécule **1a** a montré une activité antibactérienne avec uniquement les souches à Gram positif (*S. aureus* ATCC 25923 et *E. faecalis* ATCC 29212). La souche *S. aureus* ATCC 25923 a présenté le diamètre le plus important (34 mm) obtenu avec la molécule **1a**.

Les diamètres des zones d'inhibition pour les entérobactéries (bactéries à Gram négatif) varient entre 15 et 20 mm. Les diamètres les plus faibles sont obtenus avec *P. aeruginosa* ATCC 27853, les diamètres les plus élevés sont obtenus avec *K. pneumoniae* ATCC 700603.

Les CMI les plus élevées pour la série **1a-d** sont obtenues avec la souche *S. aureus* ; elles varient entre 64 et 256 µg/ml.

Les souches d'*E. faecalis* sont naturellement résistantes aux sulfamides ce qui est confirmé par leur résistance aux deux molécules témoins commercialisées. Contre toute attente, cette souche a montré une activité antibactérienne vis-à-vis de la nouvelle série de molécules de sulfamides en donnant des diamètres de zones d'inhibition importants qui varient entre 16 et 24 mm et des CMI faibles variant entre 1 et 2 µg/ml.

Concernant les souches d'entérobactéries, les CMI obtenues varient entre 1 et 128 µg/ml.

Le témoin 1 (Bactrim) n'a montré d'activité qu'avec la souche *S. aureus* (la zone d'inhibition est de 24 mm, et la CMI est de 32 µg/ml). Le témoin 2 (Sulfaguanidine) a montré une activité antibactérienne avec les 4 souches de référence (*S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 700603, et *P. aeruginosa* ATCC 27853) ; *E. faecalis* ATCC 29212 a résisté aux deux témoins.

**Tableau 18 :** Valeurs des zones d'inhibition et des CMI de la série de sulfamides **1a-d** vis-à-vis des souches de références.

Souches de référence Molécules testées	<i>S. aureus</i> ATCC 25923		<i>E. faecalis</i> ATCC 29212		<i>E. coli</i> ATCC 25922		<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	
	Z.I (mm)	CMI (µg/ml)	Z.I (mm)	CMI (µg/ml)	Z.I (mm)	CMI (µg/ml)	Z.I (mm)	CMI (µg/ml)	Z.I (mm)	CMI (µg/ml)
Témoin 1	24	32	R	R	R	R	R	R	R	R
Témoin 2	16	512	R	R	22	1	22	2	17	32
1a	34	256	24	1	R	R	R	R	R	R
1b	15	64	20	1	20	1	20	4	16	64
1c	15	128	20	2	17	64	20	4	17	64
1d	16	128	21	2	16	64	20	4	15	128

R : Résistant.

Z.I : Zone d'inhibition.

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice.

**b) La série de sulfamide 2a-f :**

La deuxième série de sulfamide **2a-f** est composée de trois molécules de structures linéaires **2a-c** et de trois molécules de structures cycliques **2d-f**. Tous les résultats sont illustrés dans le Tableau 19.

Les molécules linéaires ont montré une bonne activité antibactérienne avec les 5 souches de références, avec des diamètres de zones d'inhibition variant entre 17 et 23 mm.

*S. aureus* ATCC 25923 a montré la meilleure activité antibactérienne avec les 3 molécules linéaires **2a-c** par rapport aux trois molécules cycliques, avec des diamètres de zones d'inhibition qui varient entre 20 et 21 mm et des CMI variant entre 32 et 64 µg/ml.

Un résultat original a été également obtenu avec *E. faecalis* ATCC 29212 ; les diamètres d'inhibition varient entre 20 et 21 mm pour toutes les molécules de la nouvelle série **2a-f**. Les CMI sont faibles et varient entre 1 et 2 µg/ml.

Pour les bactéries à Gram négatif, les diamètres des zones d'inhibitions varient entre 17 et 24 mm et les CMI varient entre 0,5 et 64 µg/ml. *E. coli* ATCC 25922 a montré le meilleur résultat avec la molécule linéaire **2c**, la zone d'inhibition est de 24 mm et la CMI est faible de 1 µg/ml.

*K. pneumoniae* ATCC 700603 à montré de bons résultats avec les six molécules ; les diamètres des zones d'inhibition varient entre 21 et 23 mm et les CMI varient entre 1 et 4 µg/ml.

Les diamètres les plus faibles ont été obtenus avec la souche de référence *P. aeruginosa* ATCC 27853 (17 mm), où on note une résistance de cette souche vis-à-vis des molécules **2c**, **2d** et **2f**.

On note que les résultats obtenus avec les 3 molécules linéaires **2a-f** sont meilleurs que ceux obtenus avec les 3 molécules cycliques.

Le témoin 1 (Bactrim) n'a montré d'activité qu'avec la souche *S. aureus* ATCC 25923 (la zone d'inhibition est de 24 mm, et la CMI est de 32 µg/ml), le témoin 2 (Sulfaguanidine) à montré une activité avec les 4 souches de référence (*S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 700603, et *P. aeruginosa* ATCC 27853). *E. faecalis* ATCC 29212 est naturellement résistant aux sulfamides, elle a résisté aux deux témoins (Tableau 19).

**Tableau 19** : Valeurs des zones d'inhibition et des CMI de la série de sulfamides **2a-f** vis-à-vis des souches de références.

Molécules testées	<i>S. aureus</i> ATCC 25923		<i>E. faecalis</i> ATCC 29212		<i>E. coli</i> ATCC 25922		<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	
	Z.I (mm)	CMI (µg/ml)	Z.I (mm)	CMI (µg/ml)	Z.I (mm)	CMI (µg/ml)	Z.I (mm)	CMI (µg/ml)	Z.I (mm)	CMI (µg/ml)
<b>Témoin 1</b>	24	32	R	R	R	R	R	R	R	R
<b>Témoin 2</b>	16	512	R	R	22	1	22	2	17	32
<b>2a</b>	21	64	20	1	22	0,5	22	1	17	32
<b>2b</b>	20	64	<b>21</b>	<b>1</b>	20	32	<b>23</b>	<b>1</b>	22	8
<b>2c</b>	<b>20</b>	<b>32</b>	20	2	<b>24</b>	<b>1</b>	22	2	R	R
<b>2d</b>	16	256	20	2	17	64	20	4	R	R
<b>2e</b>	16	256	21	2	21	64	20	4	<b>22</b>	<b>4</b>
<b>2f</b>	16	256	20	1	20	2	21	2	R	R

**R** : Résistant.

**Z.I** : Zone d'inhibition.

**CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice.

### 3.2. Détermination des zones d'inhibition des deux séries de sulfamides 1a-d et 2a-f vis-à-vis des souches cliniques testées:

#### a) La série de sulfamides 1a-b :

La première série de sulfamide **1a-d** a été testée sur la totalité des souches cliniques. D'après les résultats obtenus (Tableau 20), la molécule **1a** [N-(4-methoxyphenyl) sulfamide] n'a donné d'activité qu'avec les souches à Gram positif à savoir *S. aureus* et *E. faecalis* avec des moyennes de diamètres de zones d'inhibition de  $22,15 \pm 6,22$  et  $24 \pm 0,63$  mm respectivement (Photos 6 et 7).

Concernant les trois autres molécules de sulfamides **1b-d** [N-(3-fluorophenyl) sulfamide ; N-(phenyl) sulfamide et N-(phenylethyl) sulfamide], une activité antibactérienne a été obtenue avec la majorité des souches cliniques avec des moyennes de zones d'inhibition intéressantes qui varient entre  $15,42 \pm 0,66$  et  $23,85 \pm 1,06$  mm. Les souches de *S. fonticola* et *C. freundii* sont résistantes aux quatre molécules.

Les diamètres les plus faibles ont été obtenus avec les souches de *S. aureus*, *E. coli* (Photo 8), *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* et *P. aeruginosa* (Photo 9) qui ont, préalablement, montré une importante résistance vis-à-vis des antibiotiques standards (Tableaux 12, 14 et 17). La moyenne des diamètres d'inhibition varie entre  $15,42 \pm 0,66$  mm pour la molécule **1c** avec les souches de *S. aureus* et  $18,15 \pm 1,25$  mm pour la molécule **1d** avec les souches d'*E. coli*.

Les diamètres des zones d'inhibition les plus élevés ont été obtenus avec les souches de *Salmonella sp.* et *A. baumannii* avec la molécule **1d** ; ils sont respectivement  $23,2 \pm 0,44$  et  $23,85 \pm 1,06$  mm.

*E. faecalis*, qui sont considérées comme étant des souches naturellement résistantes aux sulfamides, montrent une importante activité antibactérienne pour la molécule **1a** avec une moyenne de zones d'inhibition de  $24 \pm 0,63$  mm.

Comparant ces résultats à ceux obtenus avec les deux témoins, on note que le Bactrim (témoin1) présente des résultats similaires à ceux obtenus avec les molécules **1a-d** pour certaines espèces bactériennes et plus importants pour d'autres espèces.

La majorité des souches testées montrent une résistance au témoin 2 (sulfaguandine) excepté *S. aureus*, *S. marcescens* et *Salmonella sp.*

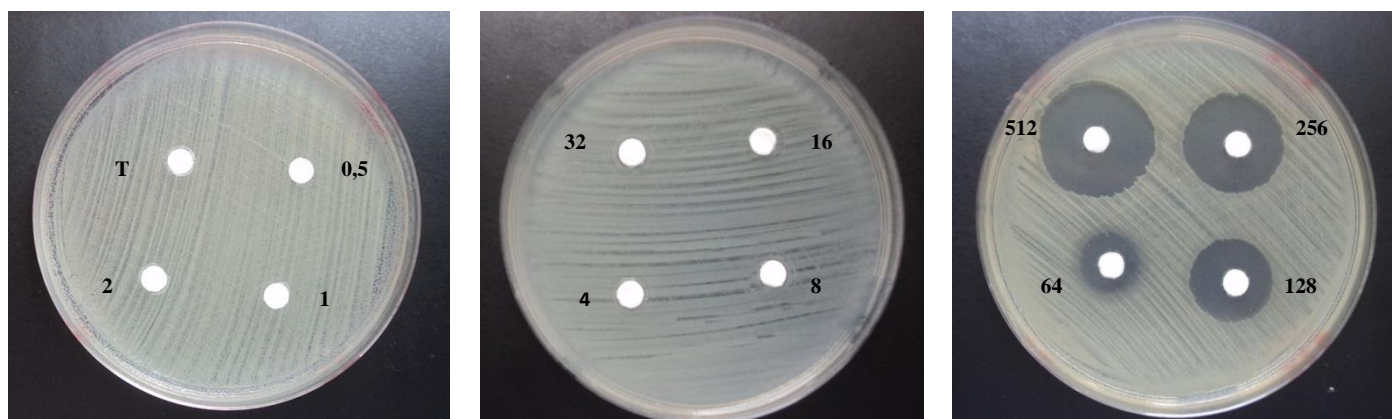
Les photos 10,11, 12, 13 et 14 montrent des diamètres de zones d'inhibition des souches cliniques obtenus avec les molécules de sulfamides **1b-d**.

**Tableau 20 :** Moyennes des diamètres des zones d'inhibition de la série de sulfamides **1a-d** vis-à-vis des souches cliniques testées.

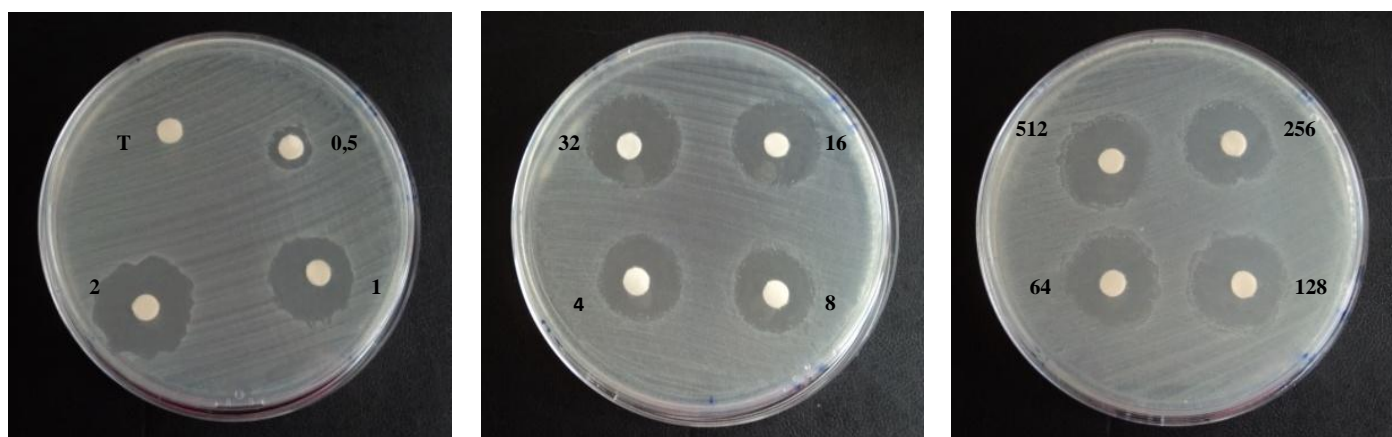
Souches bactériennes	Diamètres des zones d'inhibition (mm) ± DS					
	1a	1b	1c	1d	Témoin 1	Témoin 2
<i>S. aureus</i>	22,15 ± 6,22	16,39 ± 1,17	15,42 ± 0,66	16,27 ± 1,28	24,03 ± 4,52	16,16 ± 1,60
<i>E. faecalis</i>	24,00 ± 0,63	20,50 ± 0,83	20,83 ± 0,98	20,16 ± 0,40	R	R
<i>E. coli</i>	R	17,30 ± 0,92	17,16 ± 1,09	18,15 ± 1,25	26,41 ± 2,27	R
<i>K. pneumoniae</i>	R	17,35 ± 0,86	17,58 ± 1,00	17,70 ± 1,04	17,33 ± 1,03	R
<i>K. oxytoca</i>	R	17,00 ± 0,89	17,60 ± 0,54	17,60 ± 1,14	21,83 ± 4,02	R
<i>P. mirabilis</i>	R	21,36 ± 1,21	19,84 ± 0,89	19,94 ± 1,22	R	R
<i>P. vulgaris</i>	R	18,80 ± 1,22	19,60 ± 0,69	19,50 ± 0,97	19,20 ± 0,83	R
<i>E. cloacae</i>	R	18,10 ± 1,10	18,90 ± 0,73	18,00 ± 1,15	21,20 ± 5,21	R
<i>E. aerogenes</i>	R	20,00 ± 0,00	19,66 ± 0,57	19,33 ± 0,57	21,00 ± 1,00	R
<i>S. marcescens</i>	R	20,20 ± 0,83	19,60 ± 0,54	20,00 ± 0,70	23,00 ± 1,00	19,00 ± 1,00
<i>S. fonticola</i>	R	19,00 ± 0,00	20,00 ± 0,00	19,00 ± 0,00	26,00 ± 0,00	R
<i>S. odorifera</i>	R	R	R	R	R	R
<i>Salmonella sp.</i>	R	23,20 ± 0,44	20,40 ± 0,54	20,20 ± 0,44	22,60 ± 0,54	26,20 ± 0,83
<i>C. freundii</i>	R	R	R	R	22,66 ± 1,15	R
<i>P. aeruginosa</i>	R	17,62 ± 1,31	17,51 ± 1,26	17,43 ± 1,23	17,23 ± 1,53	R
<i>A. baumannii</i>	R	23,85 ± 1,06	21,52 ± 0,87	21,85 ± 1,06	22,08 ± 6,93	R

R : Résistant.

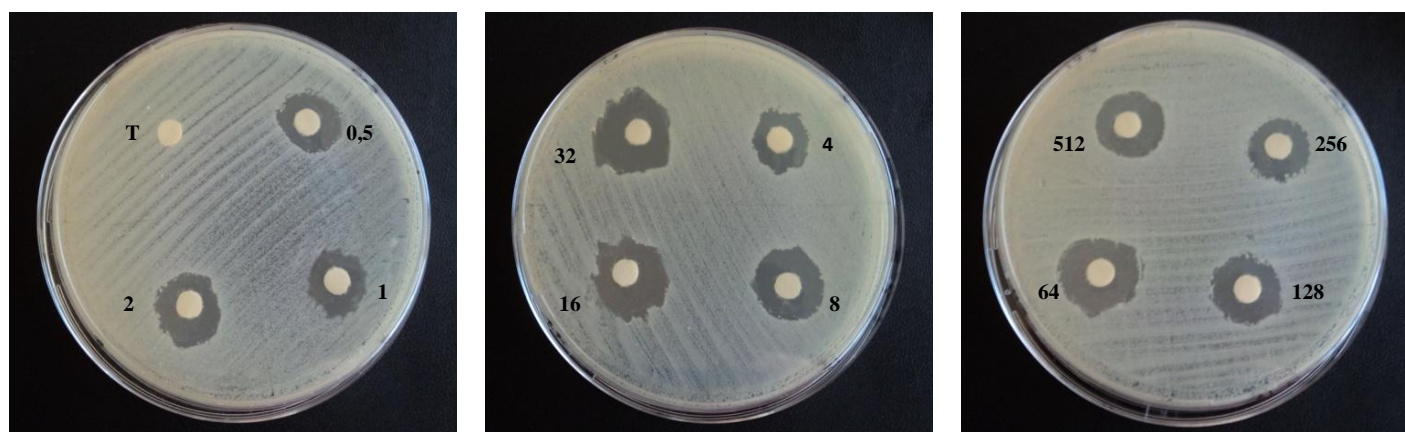
DS : Déviation Standard.



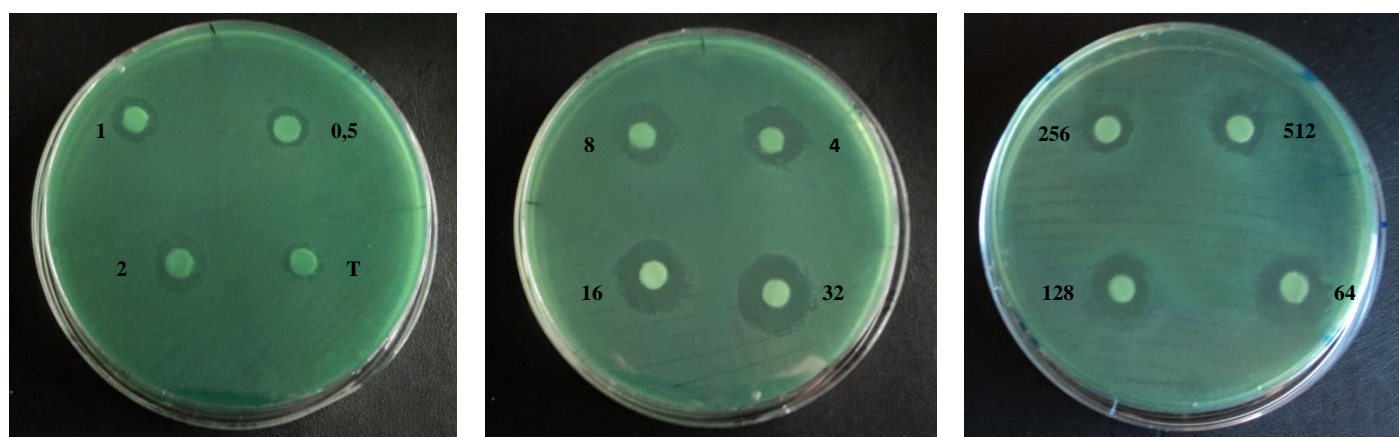
**Photo 6 :** Zones d'inhibition d'une souche nosocomiale de *S. aureus* à différentes concentrations (µg/ml) de la molécule de sulfamide **1a**.



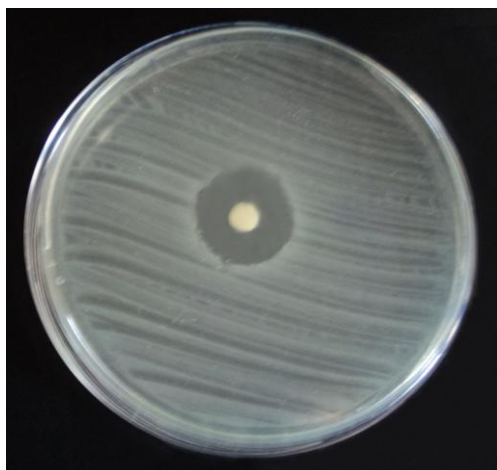
**Photo 7 :** Zones d'inhibition d'une souche nosocomiale d'*E. faecalis* à différentes concentrations ( $\mu\text{g/ml}$ ) de la molécule de sulfamide **1a**.



**Photo 8 :** Zones d'inhibition d'une souche communautaire d'*E. coli* à différentes concentrations ( $\mu\text{g/ml}$ ) de la molécule de sulfamide **1b**.



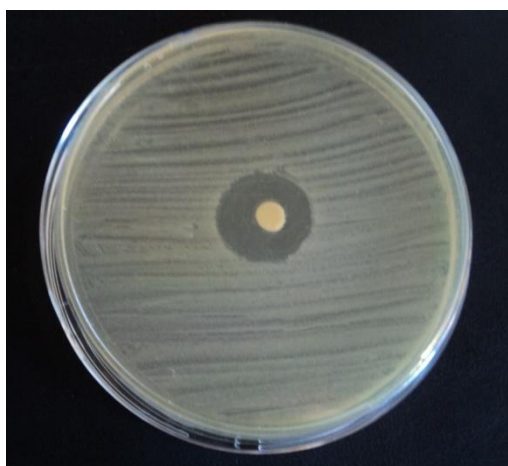
**Photo 9 :** Zones d'inhibition d'une souche communautaire de *P. aeruginosa* à différentes concentrations ( $\mu\text{g/ml}$ ) de la molécule de sulfamide **1c**.



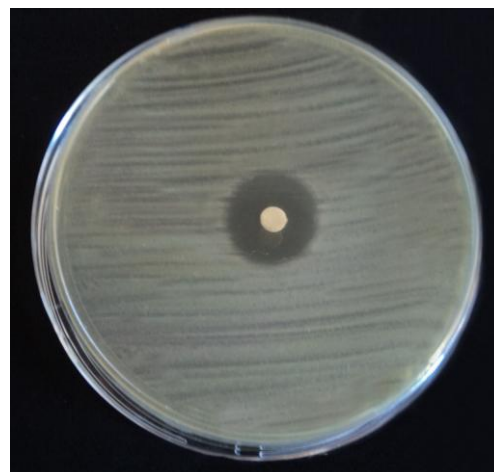
**Photo 10 :** Diamètre de la zone d'inhibition d'une souche communautaire d'*A. baumannii* (22 mm) par le sulfamide **1c** à concentration 1µg/ml.



**Photo 11 :** Diamètre de la zone d'inhibition d'une souche nosocomiale de *Salmonella sp.* (20 mm) par sulfamide **1d** à concentration 16µg/ml.



**Photo 12 :** Diamètre de la zone d'inhibition d'une souche nosocomiale de *P. mirabilis* (19mm) par le sulfamide **1b** à concentration 32µg/ml.



**Photo 13 :** Diamètre de la zone d'inhibition d'une souche nosocomiale de *P. vulgaris* (18mm) par le sulfamide **1d** à concentration 16µg/ml.



**Photo 14 :** Diamètre de la zone d'inhibition d'une souche communautaire de *S. marcescens* (21mm) par le sulfamide **1c** à concentration 32µg/ml.



**a) La série de sulfamides 2a-f :**

La deuxième série de sulfamides **2a-f** est composée de deux types de molécules:

\* trois molécules linéaires **2a-c** [ (*N, N'*- Bis (benzyl) sulfamide ; *N, N'*- Bis (phenyléthyl) sulfamide et *N, N'*- Bis (propyl) sulfamide)].

\* trois molécules cycliques **2d-f** [(*N, N'*-Dibenzyl-1,2,5-thiadiazolidine 1,1-dioxyde ; *N, N'*-bis (1-phenyléthyl)-1,2,5-thiadiazolidine 1,1-dioxyde et *N, N'*-Dipropyl-1,2,5-thiadiazolidine 1,1-dioxyde)].

Les six nouvelles molécules ont montré une bonne activité antibactérienne vis-à-vis de la totalité des souches cliniques testées. Néanmoins, les molécules linéaires ont montré une meilleure activité antibactérienne que les molécules cycliques (Tableau 21).

Les souches de *S. aureus* ont les diamètres de zones d'inhibitions les plus bas avec les six molécules, particulièrement, avec les trois molécules cycliques (Photo 15). Les moyennes des zones d'inhibition varient entre  $17,86 \pm 2,35$  et  $19 \pm 1,65$  mm pour les molécules linéaires **2a-c**, et entre  $16,85 \pm 1,96$  et  $17,16 \pm 1,92$ mm pour les molécules cycliques **2d-f**.

La nouvelle série de sulfamides a également montré une activité antibactérienne originale vis-à-vis des souches d'*E. faecalis* avec des diamètres importants variant entre  $20,33 \pm 0,51$  et  $21,66 \pm 0,51$  mm (Photo 16).

Les moyennes des diamètres des zones d'inhibitions les plus importants sont obtenues avec les souches de *K. pneumoniae* ( $24,06 \pm 1,82$  mm avec la molécule **2f**), *P. mirabilis* ( $24,47 \pm 1,07$  mm avec la molécule **2c**) et *A. baumannii* ( $25,19 \pm 1,07$  mm avec la molécule **2c**).

Il est à noter que les souches d'*A. baumannii*, qui ont montré une très importante résistance vis-à-vis des antibiotiques standards (Tableau 18), ont présenté les diamètres de zones d'inhibitions les plus élevés vis-à-vis des six nouvelles molécules de sulfamides, particulièrement avec les trois molécules linéaires **2a-c** à savoir :  $25,09 \pm 1,09$  mm avec la molécule **2a** ;  $24,47 \pm 1,16$  mm avec la molécule **2b** et  $25,19 \pm 1,07$  mm avec la molécule **2c**.

Une bonne activité antibactérienne des nouvelles molécules **2a-f** a été observée avec les souches de *Salmonella sp.* ainsi que sur les souches de *S. odorifera* et *C. freundii*, ayant présenté une résistance vis-à-vis de la première série de sulfamides **1a-d**.

Comparant ses résultats à ceux obtenus avec les deux témoins, on note que le Bactrim (temoin1) montre des résultats plus ou moins similaires aux résultats obtenus avec les molécules **2a-f**.

La majorité des souches bactériennes testées montrent une résistance au témoin 2 (sulfaguanidine), excepté les souches de *S. aureus*, *S. marcescens* et *Salmonella sp.*

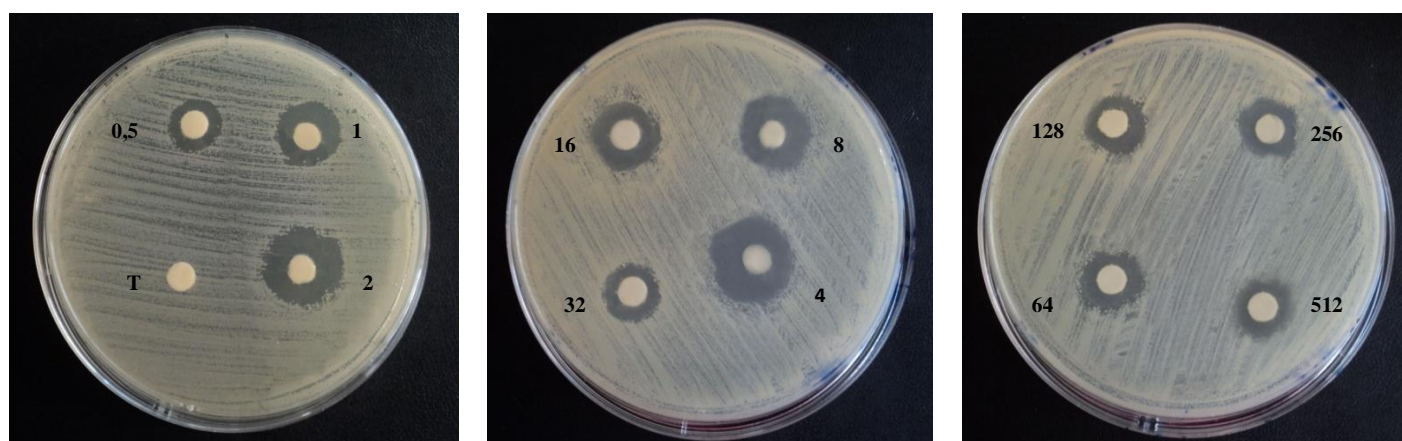
Les photos 17,18, 19, 20, 21, 22, 23 et 24 montrent des diamètres de zones d'inhibition des souches cliniques obtenus avec les molécules de sulfamides 2a-f.

**Tableau 21 :** Moyennes des diamètres des zones d'inhibition de la série de sulfamides 2a-f vis-à-vis des souches cliniques testées.

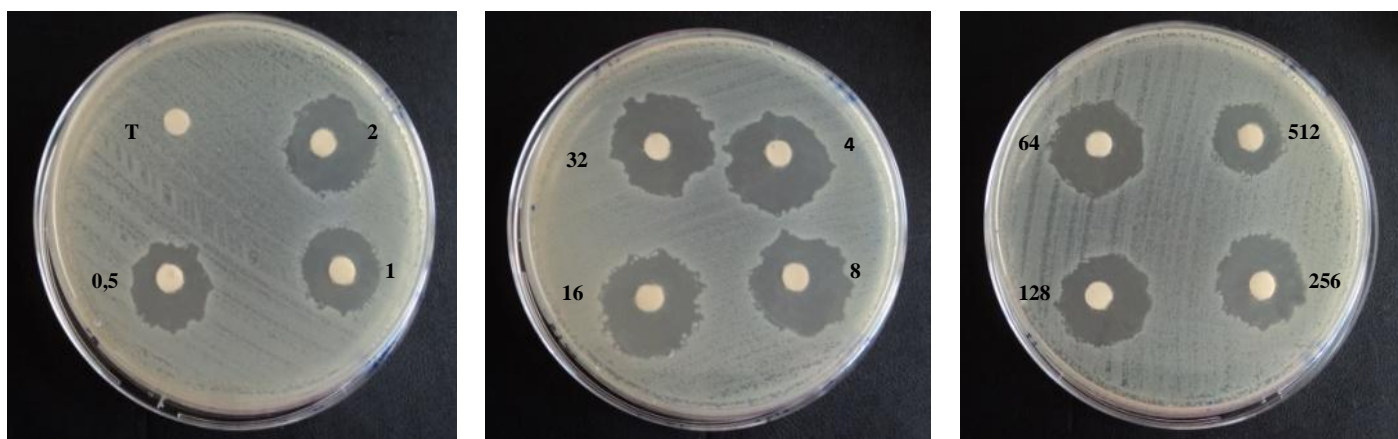
Souches bactériennes	Diamètres des zones d'inhibition (mm) ± SD							
	Molécules linéaires			Molécules cycliques			Molécules témoins	
	2a	2b	2c	2d	2e	2f	Témoin 1	Témoin 2
<i>S. aureus</i>	19,00 ± 1,66	18,27 ± 2,17	17,86 ± 2,35	17,12 ± 1,90	17,16 ± 1,92	16,85 ± 1,96	24,03 ± 4,52	16,16 ± 1,60
<i>E. faecalis</i>	21,50 ± 0,54	21,33 ± 0,51	21,66 ± 0,51	21,16 ± 0,51	20,33 ± 0,51	21,00 ± 0,63	R	R
<i>E. coli</i>	21,12 ± 2,40	20,73 ± 2,47	19,83 ± 1,94	19,39 ± 2,16	19,29 ± 1,95	18,85 ± 1,97	26,41 ± 2,27	R
<i>K. pneumoniae</i>	22,54 ± 1,78	22,61 ± 1,62	23,87 ± 1,58	23,32 ± 2,03	22,51 ± 1,71	24,06 ± 1,82	17,33 ± 1,03	R
<i>K. oxytoca</i>	20,20 ± 1,93	21,10 ± 0,87	21,80 ± 2,57	22,40 ± 1,50	23,80 ± 1,93	22,60 ± 2,22	21,83 ± 4,02	R
<i>P. mirabilis</i>	24,21 ± 1,35	23,89 ± 0,80	24,47 ± 1,07	23,00 ± 1,41	23,10 ± 0,93	23,21 ± 1,31	R	R
<i>P. vulgaris</i>	23,50 ± 0,70	23,40 ± 0,51	22,00 ± 0,81	21,10 ± 0,87	20,00 ± 0,66	20,00 ± 0,81	19,20 ± 0,83	R
<i>E. cloacae</i>	20,50 ± 1,35	20,50 ± 0,97	20,30 ± 1,05	20,60 ± 0,96	19,80 ± 1,03	19,50 ± 1,17	21,20 ± 5,21	R
<i>E. aerogenes</i>	21,66 ± 0,57	20,00 ± 00	20,66 ± 0,57	19,66 ± 0,57	19,33 ± 0,57	19,00	21,00 ± 1,00	R
<i>S. marcescens</i>	22,00 ± 00	22,66 ± 0,57	22,33 ± 0,57	21,33 ± 0,57	20,33 ± 0,57	21,33 ± 0,57	23,00 ± 1,00	19,00 ± 1,00
<i>S. fonticola</i>	20,00 ± 00	21,00 ± 00	21,00 ± 00	20,00 ± 00	20,00 ± 00	20,00 ± 00	26,00 ± 00	R
<i>S. odorifera</i>	21,00 ± 00	20,00 ± 00	20,00 ± 00	19,00 ± 00	20,00 ± 00	19,00 ± 00	R	R
<i>Salmonella sp.</i>	23,00 ± 0,70	22,00 ± 0,70	24,00 ± 00	20,80 ± 0,44	21,40 ± 0,89	20,40 ± 0,89	22,60 ± 0,54	26,20 ± 0,83
<i>C. freundii</i>	23,00 ± 1,00	23,33 ± 0,57	22,66 ± 0,57	21,33 ± 0,57	21,00 ± 1,00	21,00 ± 1,00	22,66 ± 1,15	R
<i>P. aeruginosa</i>	20,57 ± 3,11	20,32 ± 2,90	19,94 ± 2,89	19,41 ± 2,21	18,81 ± 2,14	19,00 ± 1,87	17,23 ± 1,53	R
<i>A. baumannii</i>	25,09 ± 1,09	24,57 ± 1,16	25,19 ± 1,07	22,61 ± 1,39	22,95 ± 1,77	23,19 ± 1,63	22,08 ± 6,93	R

R : Résistant.

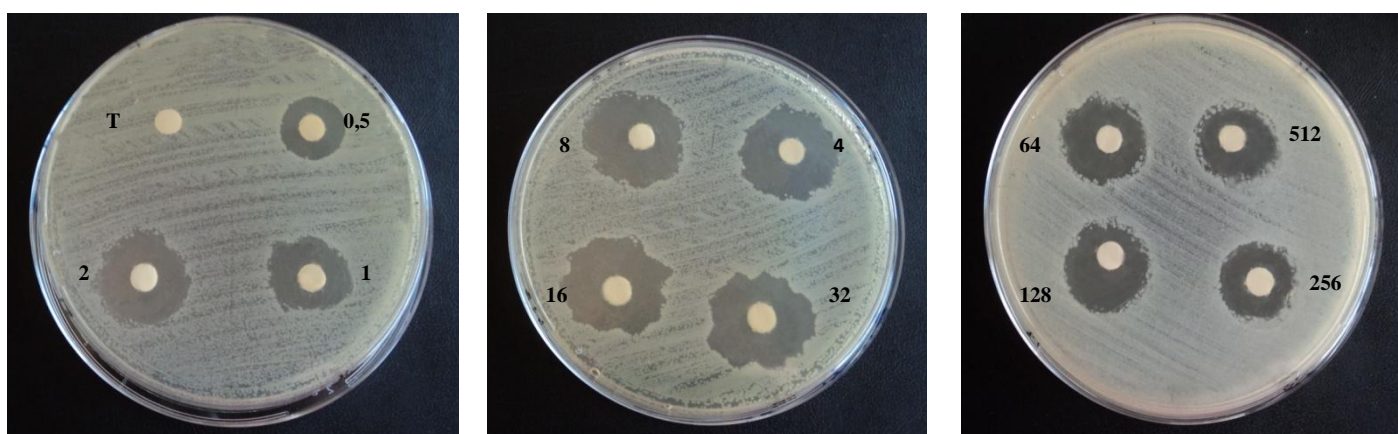
DS : Déviation Standard.



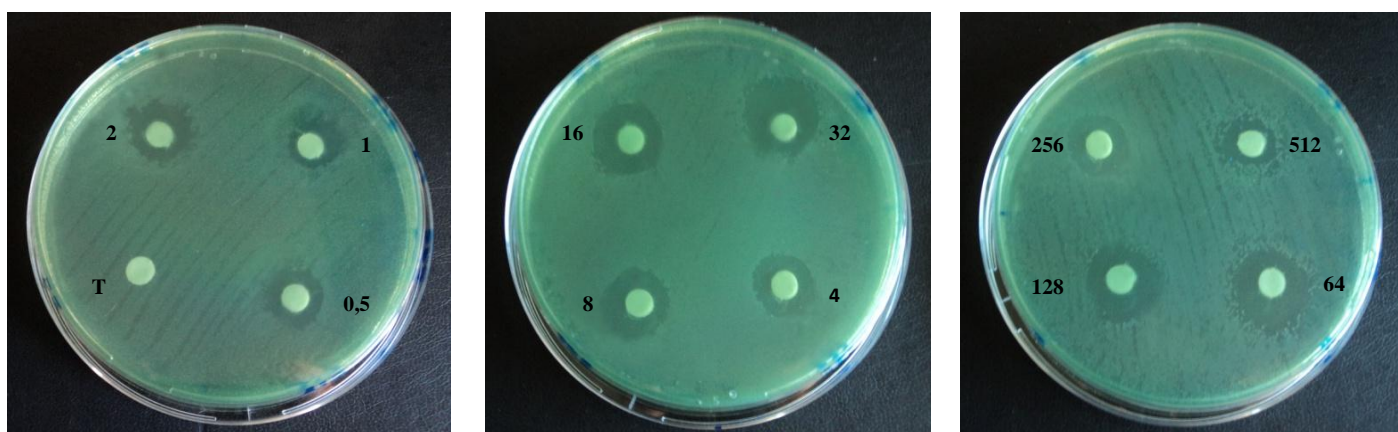
**Photo 15 :** Zones d'inhibition d'une souche nosocomiale de *S. aureus* à différentes concentrations (µg/ml) de la molécule de sulfamide 2a.



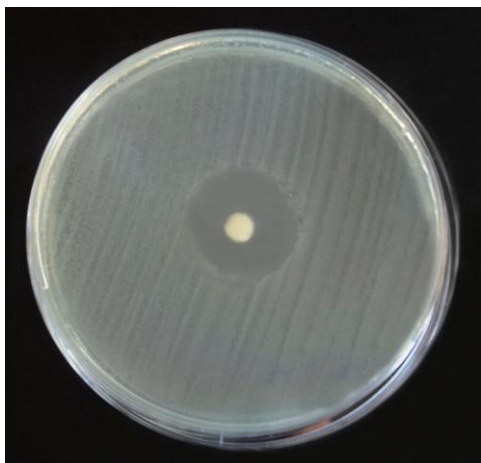
**Photo 16 :** Zones d'inhibition d'une souche nosocomiale d'*E. faecalis* à différentes concentrations ( $\mu\text{g/ml}$ ) de la molécule de sulfamide **2d**.



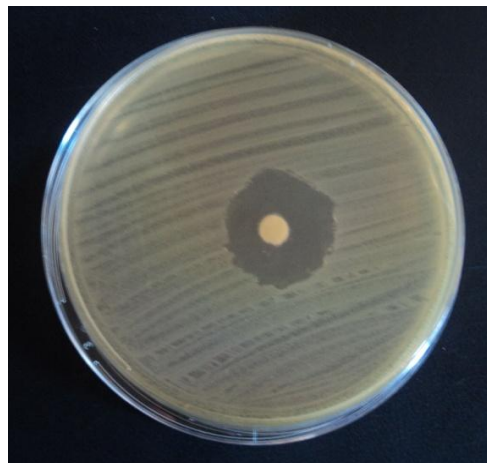
**Figure 17 :** Zones d'inhibition d'une souche communautaires d'*E. coli* à différentes concentrations ( $\mu\text{g/ml}$ ) de la molécule de sulfamide **2c**.



**Figure 18 :** Zones d'inhibition d'une souche communautaires de *P. aeruginosa* à différentes concentrations ( $\mu\text{g/ml}$ ) de la molécule de sulfamide **2b**.



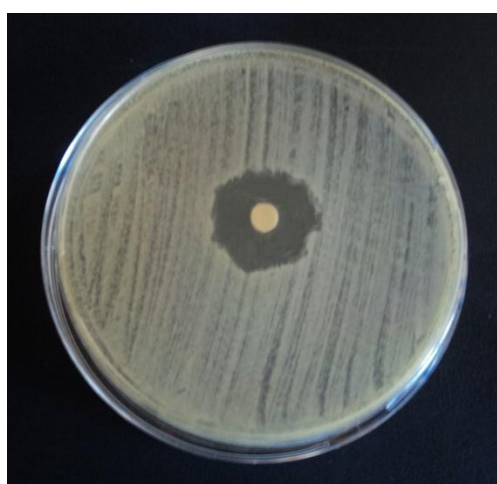
**Photo 19** : Diamètre de la zone d'inhibition d'une souche nosocomiale d'*A. baumannii* (24mm) par le sulfamide **2a** à concentration 2µg/ml.



**Photo 20** : Diamètre de la zone d'inhibition d'une souche communautaire de *C. freundii* (21mm) par le sulfamide **2b** à concentration 8 µg/ml.



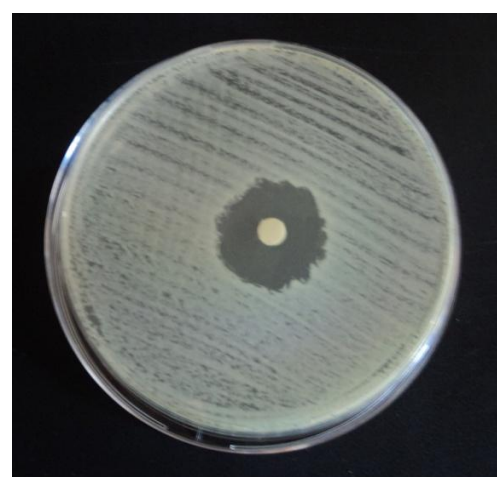
**Photo 21** : Diamètre de la zone d'inhibition d'une souche nosocomiale de *Salmonella sp.* 21mm) par le sulfamide **2f** à concentration 4µg/ml.



**Photo 22** : Diamètre de la zone d'inhibition d'une souche communautaire de *P. vulgaris* (22mm) par le sulfamide **2b** à concentration 2µg/ml.



**Photo 23** : Diamètre de la zone d'inhibition d'une souche communautaire de *P. mirabilis* (24mm) par le sulfamide **2a** à concentration 1µg/ml.



**Photo 24** : Diamètre de la zone d'inhibition d'une souche nosocomiale de *S. marcescens* (23mm) par le sulfamide **2b** à concentration 2µg/ml.

**3.3. Détermination des CMI, CMI<sub>50</sub> et CMI<sub>90</sub> des deux séries de sulfamides 1a-d et 2a-f vis-à-vis des souches cliniques testées:**

**a) La série de sulfamides 1a-d :**

➤ Les résultats des CMI, CMI<sub>50</sub> et CMI<sub>90</sub> de la série de sulfamides 1a-d vis-à-vis des souches cliniques à Gram positif sont représentés dans le Tableau 22.

Les résultats de la CMI des molécules **1a-d** pour les souches de *S. aureus* varient entre 4 et 512 µg/ml. Les CMI<sub>50</sub> varient entre 32 et 64 µg/ml et les CMI<sub>90</sub> sont égales à 128 µg/ml. Les pourcentages d'inhibition ainsi calculés sont de 80 et 82,5%.

Les souches de *S. aureus* ont montré un pourcentage d'inhibition (sensibilité) de 80% pour la première molécule **1a**, les 8 souches résistantes sont isolées à partir des urines nosocomiales (2souches), de PDP (3 souches) et de sang (3 souches). Les 7 souches résistantes aux trois autres molécules **1b**, **1c** et **1d** sont les mêmes souches isolées à partir de PDP et de sang avec en plus une souche nosocomiale isolée à partir des urines.

Un résultat original à été obtenu avec les souches d'*E. faecalis* présentant un pourcentage d'inhibition de 100%, avec des CMI faibles variant entre 1 et 8 µg/ml.

Les résultats obtenus concernant les molécules témoins pour *S. aureus* montrent un pourcentage d'inhibition de 67,5% pour le Bactrim et 14,63% pour le Sulfaguanidine.

**Tableau 22 :** Détermination des CMI, CMI<sub>50</sub> et CMI<sub>90</sub> de la série de sulfamides **1a-d** vis-à-vis des souches cliniques de *S. aureus* et d'*E. faecalis*.

Souches bactériennes	Molécules	CMI (µg/ml)			Inhibition (%)
		Intervalle	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>	
<i>S. aureus</i>	1a	256-512	271,05	ND	80
	1b	4-512	56,94	320	82,5
	1c	64-512	123,07	> 512	82,5
	1d	32-512	105,84	> 512	82,5
	Témoin 1	4-64	16,5	37	67,5
	Témoin 2	512	ND	ND	14,63
<i>E. faecalis</i>	1a	1-2	ND	ND	100
	1b	2-8	3,33	ND	100
	1c	2-8	3,33	6,66	100
	1d	2-8	3,33	ND	100
	Témoin 1	R	R	R	0
	Témoin 2	R	R	R	0

ND : Non Déterminé.

R : résistant.

➤ Les résultats des CMI, CMI<sub>50</sub> et CMI<sub>90</sub> la série de sulfamides 1a-d vis-à-vis des souches cliniques à Gram négatif fermentaires de sont représentés dans les Tableaux 23, 24 et 25.

*E. coli*, *K. pneumoniae* et *K. oxytoca* sont parmi les souches qui ont présenté une importante résistance vis-à-vis des nouvelles molécules 1b-d. Les CMI varient entre 32 et 512 µg/ml pour 1b-c et entre 16 et 128 pour 1d. Les pourcentages d'inhibition varient entre 50 et 62,5% (Tableau 23). Les CMI<sub>50</sub> et CMI<sub>90</sub> sont faibles ce qui confirme le haut niveau de sensibilité vis-à-vis des nouvelles molécules.

**Tableau 23 :** Détermination des CMI, CMI<sub>50</sub> et CMI<sub>90</sub> de la série de sulfamides 1a-d vis-à-vis des souches cliniques d'*E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *P. mirabilis* et de *P. vulgaris*.

Souches bactériennes	Molécules	CMI (µg/ml)			Inhibition (%)
		Intervalle	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>	
<i>E. coli</i>	1a	R	R	R	0
	1b	32-256	80	256	62,5
	1c	32-512	256	416	56,25
	1d	32-512	28,57	> 512	59,37
	Témoin 1	0,5-2	0,8	2	37,5
	Témoin 2	R	R	R	0
<i>K. pneumoniae</i>	1a	R	R	R	0
	1b	32-512	108,8	277,33	54,83
	1c	32-512	44	> 512	54,83
	1d	32-512	48	320	54,83
	Témoin 1	8-16	ND	12,1	18,75
	Témoin 2	R	R	R	0
<i>K. oxytoca</i>	1a	R	R	R	0
	1b	32-128	48	96	60
	1c	32-64	40	ND	50
	1d	16-128	28	48	50
	Témoin 1	2-16	7	12,5	60
	Témoin 2	R	R	R	0
<i>P. mirabilis</i>	1a	R	R	R	0
	1b	1-8	1,75	10	100
	1c	1-8	3,28	5,66	100
	1d	1-16	3,75	30	100
	Témoin 1	R	R	R	0
	Témoin 2	R	R	R	0
<i>P. vulgaris</i>	1a	R	R	R	0
	1b	4-64	7	96	100
	1c	2-16	3	24	100
	1d	2-16	3,33	28	100
	Témoin 1	4-8	ND	ND	50
	Témoin 2	R	R	R	0

ND : Non Déterminé.

R : résistant.

Les entérobactéries figurant dans les Tableaux 24 et 25 ont présenté une activité antibactérienne intéressante vis-à-vis de ces 3 molécules avec des CMI qui varient entre 0,5 et 64 µg/ml.

**Tableau 24** : Détermination des CMI, CMI<sub>50</sub> et CMI<sub>90</sub> de la série de sulfamides **1a-d** vis-à-vis des souches cliniques d'*E. cloacae* et d'*E. aerogenes*.

Souches bactériennes	Molécules	CMI (µg/ml)			Inhibition (%)
		Intervalle	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>	
<i>E. cloacae</i>	1a	R	R	R	0
	1b	16-64	25,6	ND	100
	1c	16-32	ND	ND	100
	1d	16-64	28	40	100
	Témoin 1	0,5-4	3,5	3,75	50
	Témoin 2	R	R	R	0
<i>E. aerogenes</i>	1a	R	R	R	0
	1b	8	ND	4	100
	1c	8-16	ND	4	100
	1d	4-16	6	12	100
	Témoin 1	2-4	2,5	2,5	100
	Témoin 2	R	R	R	0

ND : Non Déterminé.  
R : résistant.

*S. marcescens* et *Salmonella sp.* ont présenté les meilleurs résultats avec des CMI variant entre 1 et 8 µg/ml et 0,5 et 4 µg/ml respectivement (Tableau 25).

Le pourcentage de sensibilité est de 100% pour ces souches, excepté pour *S. odorifera* et *C. freundii* qui se sont montrées résistantes aux nouvelles molécules ainsi qu'aux témoins (Tableau 25).

Pour certaines molécules les MIC<sub>50</sub> et MIC<sub>90</sub> n'ont pas pu être calculés car l'effectif était faible ou bien les CMI étaient très proches ou identiques.

La molécule **1a** ne montre aucun effet antibactérien vis-à-vis des souches d'entérobactéries (bacilles à Gram négatif). Les molécules **1b-d** ont présenté une activité antibactérienne moyenne vis-à-vis des souches d'*E. coli*. Le pourcentage de sensibilité pour la molécule **1b** est de 62,5% ; 14 souches se sont montrées résistantes, parmi lesquelles 8 souches nosocomiales. Les mêmes souches ont résisté aux molécules **1c** (12 souches résistantes) et **1d** (13 souches résistantes), excepté la sensibilité de 2 souches communautaires isolées à partir des urines.

*K. pneumoniae* a montré un pourcentage de sensibilité de 54,83% avec les 3 molécules **1b-d**. Les 14 souches résistantes sont isolées à partir de pus (6 souches : 3 souches nosocomiales et 3

souches communautaires), de sang (2 souches nosocomiales), de PDP (4 souches nosocomiales) et de 2 souches isolées à partir de liquide pleural nosocomial.

Quand aux souches de *K. oxytoca*, le pourcentage de sensibilité est de 60% pour la molécule **1b** et de 50% pour les molécules **1c-d**. Les 4 souches résistantes à la molécule **1b** sont isolées à partir des urines (1 souche nosocomiale et 2 souches communautaires), et une souche isolée à partir de pus nosocomial. Ces mêmes souches ont résisté aux deux molécules **1c-d** en plus d'une souche isolée à partir des urines communautaires.

**Tableau 25** : Détermination des CMI, CMI<sub>50</sub> et CMI<sub>90</sub> de la série de sulfamides **1a-d** vis-à-vis des souches cliniques de *S. marcescens*, *S. fonticola*, *S. odorifera*, *Salmonella sp.* et de *C. freundii*.

Souches bactériennes	Molécules	CMI (µg/ml)			Inhibition (%)
		Intervalle	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>	
<i>S. marcescens</i>	1a	R	R	R	0
	1b	1-2	ND	ND	100
	1c	1-4	1,75	2,5	100
	1d	1-4	1,75	2,5	100
	Témoin 1	4-8	ND	ND	100
	Témoin 2	R	R	R	0
<i>S. fonticola</i>	1a	R	R	R	0
	1b	8	ND	ND	100
	1c	4	ND	ND	100
	1d	8	ND	ND	100
	Témoin 1	8	ND	ND	100
	Témoin 2	R	R	R	0
<i>S. odorifera</i>	1a	R	R	R	0
	1b	R	R	R	0
	1c	R	R	R	0
	1d	R	R	R	0
	Témoin 1	R	R	R	0
	Témoin 2	R	R	R	0
<i>Salmonella sp.</i>	1a	R	R	R	0
	1b	0,5-2	ND	2,5	100
	1c	1-2	1,16	ND	100
	1d	1-4	1,75	2,5	100
	Témoin 1	1-4	1	1,25	100
	Témoin 2	0,5-2	1	1,25	100
<i>C. freundii</i>	1a	R	R	R	0
	1b	R	R	R	0
	1c	R	R	R	0
	1d	R	R	R	0
	Témoin 1	2-4	ND	ND	100
	Témoin 2	R	R	R	0

ND : Non Déterminé.  
R : résistant.



- Les résultats des CMI, CMI<sub>50</sub> et CMI<sub>90</sub> de la série de sulfamides 1a-d vis-à-vis des souches cliniques à Gram négatif non fermentaires sont représentés dans le Tableau 26.

Les bactéries à Gram négatif non fermentaires, à savoir *P. aeruginosa* et *A. baumannii* ont des sensibilités différentes vis-à-vis des molécules testées. Pour *P. aeruginosa*, les CMI varient entre 32 et 512 µg/ml avec des pourcentages d'inhibition moyens qui varient entre 50 et 57,81 µg/ml.

*A. baumannii* sont les souches les plus sensibles ; les CMI sont faibles et varient entre 0,5 et 2 µg/ml affichant ainsi une très bonne inhibition de 100%.

Le pourcentage de sensibilité des souches de *P. aeruginosa* vis-à-vis des trois molécules de sulfamides 1b-d est de 50%, 54,68% et 57,81% respectivement. Les souches résistantes sont isolées à partir des urines (4 souches nosocomiales et 2 souches communautaires), de pus (8 souches nosocomiales et 4 souches communautaires), de PDP (10 souches nosocomiales) et de liquide pleural (4 souches nosocomiales).

**Tableau 26 :** Détermination des CMI, CMI<sub>50</sub> et CMI<sub>90</sub> de la série de sulfamides 1a-d vis-à-vis des souches cliniques de *P. aeruginosa* et d'*A. baumannii*.

Souches bactériennes	Molécules	CMI (µg/ml)			Inhibition (%)
		Intervalle	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>	
<i>P. aeruginosa</i>	1a	R	R	R	0
	1b	32-256	60,44	277,33	50
	1c	32-512	148	> 512	54,68
	1d	32-512	165,33	> 512	57,81
	Témoin 1	8-64	20,62	43,5	20,31
	Témoin 2	128-256	128	155,3	10
<i>A. baumannii</i>	1a	R	R	R	0
	1b	0,5-2	ND	2,5	100
	1c	0,5-2	0,53	1,8	100
	1d	0,5-2	ND	2,5	100
	Témoin 1	0,5-8	3,5	7,5	57,14
	Témoin 2	R	R	R	0

ND : Non Déterminé.

R : résistant.

**b) la série de sulfamides 2a-f :**

➤ Les résultats des CMI, CMI<sub>50</sub> et CMI<sub>90</sub> de la série de sulfamides 2a-f vis-à-vis des souches cliniques à Gram positif sont représentés dans le Tableau 27.

La CMI des bactéries à Gram positif testées pour les six nouvelles molécules sont très intéressantes ; pour *S. aureus* elle varie entre 4 et 256 µg/ml. La CMI<sub>50</sub> varie entre 18,13 et 79 µg/ml, quant à la CMI<sub>90</sub>, elle varie entre 73,4 et 155,3 µg/ml. Les pourcentages d'inhibition sont importants et varient entre 75 et 92,5%.

*E. faecalis* à présenté des CMI faibles variant entre 0,5 et 8 µg/ml avec un pourcentage d'inhibition de 100%. On note également que les CMI pour les molécules linéaires sont plus faibles que celles pour les molécules cycliques.

Pour les souches de *S. aureus*, les trois molécules linéaires 2a-c ont montré un pourcentage d'inhibition élevé par rapport aux pourcentages obtenus avec les molécules de la première série 1a-d et aux molécules cycliques 2d-f. Le pourcentage d'inhibition est de 92,5%.

Les souches ayant montré une résistance sont des souches nosocomiales isolées à partir de PDP (2 souches) et de sang (1 souche).

**Tableau 27 :** Détermination des CMI, CMI<sub>50</sub> et CMI<sub>90</sub> de la série de sulfamides 2a-f vis-à-vis des souches cliniques de *S. aureus* et d'*E. faecalis*.

Souches bactériennes	Molécules	CMI (µg/ml)			Inhibition (%)
		Intervalle	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>	
<i>S. aureus</i>	2a	16-128	38,92	155,3	92,5
	2b	4-128	38,35	150,41	92,5
	2c	16-128	18,13	73,4	92,5
	2d	32-256	71,1	141,3	75
	2e	32-256	47	145	75
	2f	16-256	79	142,88	75
	Témoin 1	4-64	16,5	37	67,5
	Témoin 2	512	ND	ND	14,63
<i>E. faecalis</i>	2a	0,5-2	ND	ND	100
	2b	1-4	ND	ND	100
	2c	0,5-2	1,66	ND	100
	2d	2-8	4	ND	100
	2e	2-8	4	ND	100
	2f	1-8	3,33	ND	100
	Témoin 1	R	R	R	0
	Témoin 2	R	R	R	0

ND : Non Déterminé.  
R : résistant.

En ce qui concerne les 3 molécules cycliques, la sensibilité est de 75% ; les souches résistantes sont également des souches nosocomiales isolées à partir de pus (4 souches), de PDP (3 souches) et de sang (3 souches).

➤ **Les résultats des CMI, CMI<sub>50</sub> et CMI<sub>90</sub> de la série de sulfamides 2a-f vis-à-vis des souches cliniques à Gram négatif fermentaires sont représentés dans les Tableaux 28, 29 et 30.**

En ce qui concerne les entérobactéries, les CMI de la série de sulfamide **2a-f** sont très intéressantes, elles varient entre 0,5 et 8 µg/ml pour la majorité des souches testées. Seules les souches d'*E. coli* présentent les CMI les plus élevées variant entre 0,5 et 128 µg/ml avec des pourcentages d'inhibition très importants allant de 84,37 à 96,86%. Le pourcentage d'inhibition varie entre 84,09% et 100% pour les souches de *K. pneumoniae*. Pour le reste des souches le pourcentage d'inhibition est de 100%.

Les CMI<sub>50</sub> et CMI<sub>90</sub> sont très importantes ; elles sont de 0,54 à 3,5 µg/ml pour les CMI<sub>50</sub> et de 1 à 4,5 µg/ml pour les CMI<sub>90</sub>. *E. coli*, *K. pneumoniae* et *K. oxytoca* ont les CMI<sub>50</sub> et CMI<sub>90</sub> les plus élevées variant entre 1,75 et 22,12 µg/ml et 3,66 et 83,87 µg/ml respectivement (Tableau 28).

On remarque que les molécules linéaires **2a-c** présentent des résultats plus importants que les molécules cycliques **2d-f**.

Les pourcentages d'inhibition des souches d'*E. coli* pour les 3 molécules linéaires sont de 96,87% pour la molécule **2a** et de 93,75% pour les deux molécules **2b-c**.

La souche résistante à la molécule **2a** est isolée à partir du PDP (nosocomial), les deux souches résistantes aux molécules **2b-c** sont isolées à partir de PDP (la même souche nosocomiale résistante à **2a**) et de pus vaginal nosocomial (1 souche).

Concernant les 3 molécules cycliques **2d-f**, les pourcentages de sensibilité sont 87,5% pour la molécule **2d** et 84,37% pour les molécules **2e-f**. Les souches résistantes sont des souches nosocomiales isolées à partir des urines (2 souches) et de PDP (2 souches). Pour la molécule **2d**, les mêmes souches sont résistantes aux deux autres molécules en plus d'une autre souche isolée à partir des urines nosocomiales.

Pour les souches de *K. pneumoniae*, seules trois souches ont résisté aux 3 molécules cycliques **2d-f** ; ces souches sont isolées à partir de PDP nosocomials.

**Tableau 28 :** Détermination des CMI, CMI<sub>50</sub> et CMI<sub>90</sub> de la série de sulfamides **2a-f** vis-à-vis des souches cliniques d'*E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *P. mirabilis* et de *P. vulgaris*.

Souches bactériennes	Molécules	CMI (µg/ml)			Inhibition (%)
		Intervalle	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>	
<i>E. coli</i>	2a	0,5- 16	3,4	45	96,87
	2b	0,5-64	10,83	83	93,75
	2c	0,5-64	3,71	46,66	93,75
	2d	2-128	10,83	83	87,5
	2e	4-128	10,9	82,87	84,37
	2f	4-128	22,12	73,06	84,37
	Témoin 1	0,5-2	0,8	2	37,5
	Témoin 2	R	R	R	0
<i>K. pneumoniae</i>	2a	0,5-8	3,4	45	100
	2b	0,5-8	6,25	12,1	100
	2c	0,5-8	3,71	46,66	100
	2d	0,5-8	10,83	83	90,32
	2e	0,5-8	10,9	82,87	90,32
	2f	0,5-8	22,12	73,31	90,32
	Témoin 1	8-16	ND	12,1	18,75
	Témoin 2	R	R	R	0
<i>K. oxytoca</i>	2a	0,5-8	4	6,33	100
	2b	0,5-8	2,25	17	100
	2c	0,5-4	2,2	2,08	100
	2d	0,5-8	1,66	10	100
	2e	0,5-4	ND	4,5	100
	2f	0,5-4	1,75	3,66	100
	Témoin 1	2-16	7	12,5	60
	Témoin 2	R	R	R	0
<i>P. mirabilis</i>	2a	0,5-2	ND	3,16	100
	2b	0,5-1	ND	ND	100
	2c	0,5-1	ND	ND	100
	2d	0,5-2	0,64	2,16	100
	2e	0,5-2	0,75	1,9	100
	2f	0,5-2	0,78	1,87	100
	Témoin 1	R	R	R	0
	Témoin 2	R	R	R	0
<i>P. vulgaris</i>	2a	0,5-2	ND	3,16	100
	2b	0,5-1	ND	ND	100
	2c	0,5-1	ND	ND	100
	2d	0,5-2	ND	3,16	100
	2e	0,5-2	ND	3,16	100
	2f	0,5-2	ND	3,16	100
	Témoin 1	4-8	ND	ND	50
	Témoin 2	R	R	R	0

ND : Non Déterminé.  
R : résistant.

Concernant les autres entérobactéries, un très bon résultat a été obtenu vis-à-vis des six nouvelles molécules de la série **2a-f**. Les CMI varient entre 0,5 et 8 µg/ml (Tableau 29, 30 et 31) avec un pourcentage d'inhibition de 100%.

Les souches cliniques ayant présenté une résistance vis-à-vis des 3 molécules de la série **1a-d** se sont montrées sensibles aux molécules de la série **2a-f** (*S. odorifera* et *C. freundii*).

**Tableau 29** : Détermination des CMI, CMI<sub>50</sub> et CMI<sub>90</sub> de la série de sulfamides **2a-f** vis-à-vis des souches cliniques d'*E. cloacae* et d'*E. aerogenes*.

Souches bactériennes	Molécules	CMI (µg/ml)			Inhibition (%)
		Intervalle	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>	
<i>E. cloacae</i>	2a	0,5-4	1,33	4,5	100
	2b	0,5-2	0,8	2	100
	2c	0,5-4	1,12	5	100
	2d	0,5-4	1,62	6	100
	2e	0,5-4	1,37	4,5	100
	2f	0,5-4	3	3,25	100
	Témoin 1	0,5-4	3,5	3,75	50
	Témoin 2	R	R	R	0
<i>E. aerogenes</i>	2a	1-2	2,5	2,5	100
	2b	2-4	2,5	2,5	100
	2c	1-2	2,5	2,5	100
	2d	2-4	2,5	2,5	100
	2e	1-4	1,5	4	100
	2f	2-4	2,5	2,5	100
	Témoin 1	2-4	2,5	2,5	100
	Témoin 2	R	R	R	0

**ND** : Non Déterminé.

**R** : résistant.

**Tableau 30 :** Détermination des CMI, CMI<sub>50</sub> et CMI<sub>90</sub> de la série de sulfamides **2a-f** vis-à-vis des souches cliniques de *S. marcescens*, *S. fonticola*, *S. odorifera*, *Salmonella sp.* et de *C. freundii*.

Souches bactériennes	Molécules	CMI (µg/ml)			Inhibition (%)
		Intervalle	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>	
<i>S. marcescens</i>	2a	0,5-2	1	1,25	100
	2b	0,5-1	ND	ND	100
	2c	0,5-2	1	1,25	100
	2d	2-4	ND	ND	100
	2e	2-4	ND	ND	100
	2f	2-4	ND	ND	100
	Témoin 1	4-8	ND	ND	100
	Témoin 2	R	R	R	0
<i>S. fonticola</i>	2a	1	ND	ND	100
	2b	4	ND	ND	100
	2c	2	ND	ND	100
	2d	4	ND	ND	100
	2e	8	ND	ND	100
	2f	4	ND	ND	100
	Témoin 1	8	ND	ND	100
	Témoin 2	R	R	R	0
<i>S. odorifera</i>	2a	4	ND	ND	100
	2b	2	ND	ND	100
	2c	4	ND	ND	100
	2d	8	ND	ND	100
	2e	8	ND	ND	100
	2f	8	ND	ND	100
	Témoin 1	R	R	R	0
	Témoin 2	R	R	R	0
<i>Salmonella sp.</i>	2a	0,5-1	ND	ND	100
	2b	0,5-2	1	1,25	100
	2c	0,5	ND	ND	100
	2d	1-4	1	1,25	100
	2e	2-4	ND	ND	100
	2f	1-4	1	1,25	100
	Témoin 1	1-4	1	1,25	100
	Témoin 2	0,5-2	1	1,25	100
<i>C. freundii</i>	2a	1-2	0,5	1	100
	2b	2-4	ND	ND	100
	2c	1-2	ND	ND	100
	2d	2-4	ND	ND	100
	2e	1-4	1	1,25	100
	2f	2-4	ND	ND	100
	Témoin 1	2-4	ND	ND	100
	Témoin 2	R	R	R	0

ND : Non Déterminé.  
R : résistant.

➤ **Les résultats des CMI, CMI<sub>50</sub> et CMI<sub>90</sub> de la série de sulfamides 2a-f vis-à-vis des souches cliniques à Gram négatif non fermentaires sont représentés dans le Tableau 31.**

Les CMI pour *P. aeruginosa* varient entre 0,5 et 128 µg/ml pour les molécules linéaires **2a-c** et entre 1 et 128 µg/ml pour les molécules cycliques **2d-f**. Les CMI<sub>50</sub> varient entre 3,12 et 21,33 µg/ml ; les MIC<sub>90</sub> varient entre 21,8 et 78,5 µg/ml. Les pourcentages d'inhibition varient entre 65,62 et 84,37%.

*A. baumannii* a montré une plus grande sensibilité vis-à-vis de ces molécules avec une sensibilité de 100% et des CMI variant entre 0,5 et 1 µg/ml pour les molécules linéaires **2a-c**, et entre 0,5 et 8 µg/ml pour les molécules cycliques **2d-f**.

On remarque également que les résultats obtenus pour les molécules linéaires sont plus importants que ceux obtenus avec les molécules cycliques.

Les pourcentages d'inhibition des souches de *P. aeruginosa* vis-à-vis des 3 molécules linéaires **2a-c** sont de 81,25% pour les molécules **2a-b** et de 82,81% pour la molécule **2c**.

Les 10 souches résistantes nosocomiales sont isolées à partir de pus (4 souches), de PDP (4 souches) et de liquide pleural (2 souches).

Concernant les trois molécules cycliques **2d-f**, les pourcentages d'inhibition sont de 65,62%, 68,75% et 67,18% respectivement. Les souches résistantes à la molécule **2d** sont isolées à partir de pus nosocomiale (8 souches), de PDP (10 souches) et de liquide pleural (4 souches).

**Tableau 31** : Détermination des CMI, CMI<sub>50</sub> et CMI<sub>90</sub> de la série de sulfamides **2a-f** vis-à-vis des souches cliniques de *P. aeruginosa* et d'*A. baumannii*.

Souches bactériennes	Molécules	CMI (µg/ml)			Inhibition (%)
		Intervalle	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>	
<i>P. aeruginosa</i>	2a	0,5-128	3,12	21,8	81,25
	2b	0,5-128	4,75	78,5	81,25
	2c	0,5-128	4,05	41,41	82,81
	2d	1-128	6,25	73,33	65,62
	2e	2-128	21,33	72	68,75
	2f	1-128	12,37	75,07	67,18
	Témoin 1	8-64	20,62	43,5	20,31
	Témoin 2	128-256	128	155,3	10
<i>A. baumannii</i>	2a	0,5-1	ND	ND	100
	2b	0,5-1	ND	0,25	100
	2c	0,5-2	ND	0,16	100
	2d	0,5-8	2,7	3,25	100
	2e	0,5-8	1,2	6,87	100
	2f	0,5-8	4,5	6,62	100
	Témoin 1	0,5-8	3,5	7,5	57,14
	Témoin 2	R	R	R	0

ND : Non Déterminé.  
R : résistant.

### 3.4. Pourcentages de sensibilité aux antibiotiques standards et aux deux séries de sulfamides **1a-d** et **2a-f** des souches cliniques testées :

Les résultats obtenus (Tableau 32) montrent que les souches de *S. aureus*, qui présentent une sensibilité moyenne à faible vis-à-vis des antibiotiques standards utilisés en thérapeutique, présentent une sensibilité importante vis-à-vis des deux séries de sulfamides **1a-d** et **2a-f**.

Cette sensibilité atteint 92,5% pour les souches de *S. aureus* avec les molécules linéaires **2a-c**, et 75% avec les molécules cycliques **2d-f** de la 2<sup>ème</sup> série **2a-f**. La sensibilité varie entre 80 et 82,5% avec les molécules **2b-d**, ces résultats restent très importants par rapport aux deux témoins où la sensibilité est de 67,5 et 14,63% pour le Bactrim (T1) et le Sulfaguandine (T2) respectivement (Tableau 22).

*E. coli* et *K. pneumoniae* sont parmi les souches les plus résistantes vis-à-vis des antibiotiques standards. Avec la première série **1b-d** la sensibilité varie entre 55,25 et 62,5% pour *E. coli* et elle est de 54,83% pour *K. pneumoniae*.

La sensibilité est bien plus importante avec la deuxième série **2a-f** ; elle varie entre 93,75 et 96,87% pour les molécules linéaires **2a-c**, et entre 84,37 et 87,5% pour les molécules cycliques **2d-f** en ce qui concerne les souches d'*E. coli*.



Pour *K. pneumoniae*, la sensibilité varie entre 96,77 et 100% pour les molécules linéaires **2a-c**, et entre 87,09 et 90,32% pour les molécules cycliques **2d-f**.

Concernant les autres souches d'entérobactéries testées, la sensibilité est de 100% pour les deux séries de sulfamides. Ces souches présentent une sensibilité variable vis-à-vis des antibiotiques standards ainsi qu'aux témoins.

*P. aeruginosa* et *A. baumannii* sont des souches qui résistent à plusieurs antibiotiques standards. Vis-à-vis des nouvelles molécules, *P. aeruginosa* montre une sensibilité qui varie entre 50 et 57,81% pour les molécules **1b-d** de la première série, et entre 65,62 et 84,37% pour les molécules **2a-f** de la deuxième série.

Concernant *A. baumannii*, la sensibilité est de 100% pour les molécules des deux séries.

On note que les molécules linéaires **2a-c** sont plus actives avec des pourcentages de sensibilité importants vis-à-vis des souches testées.

**Tableau 32 :** Pourcentages de sensibilité aux antibiotiques standards et aux deux séries de sulfamides **1a-d** et **2a-f** des souches cliniques testées.

Souches bactériennes	Antibiotiques standards														Témoins		Série 1a-d				Série 2a-f					
	P	OX	FOX	AMC	CAZ	CTX	CRO	TM	AK	GM	IMP	TIC	C	PIP	T1	T2	1a	1b	1c	1d	2a	2b	2c	2d	2e	2f
<i>S. aureus</i>	2,5	32,5	30	/	/	/	/	25	37,5	42,5	/	/	47,5	/	67,5	14,63	80	82,5	82,5	82,5	92,5	92,5	92,5	75	75	75
<i>E. faecalis</i>	100	0	0	100	/	/	/	0	0	0	83,34	/	100	/	0	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>E. coli</i>	/	/	100	0	59,38	50	68,75	0	100	100	100	0	100	/	37,5	0	0	62,5	56,25	59,37	96,87	93,75	93,75	87,5	84,37	84,37
<i>K. pneumoniae</i>	/	/	90,33	0	0	0	61,3	0	22,59	0	100	0	100	/	18,75	0	0	54,83	54,83	54,83	100	96,77	96,77	90,32	87,09	87,09
<i>K. oxytoca</i>	/	/	100	0	0	0	50	0	20	0	100	0	100	/	60	0	0	60	50	50	100	100	100	100	100	100
<i>P. mirabilis</i>	/	/	100	0	100	100	100	100	100	100	100	0	100	/	0	0	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>P. vulgaris</i>	/	/	100	0	100	100	100	100	100	100	100	0	100	/	50	0	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>E. cloacae</i>	/	/	0	40	40	30	50	40	100	30	100	0	30	/	50	0	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>E. aerogenes</i>	/	/	0	0	0	0	100	100	100	100	100	0	100	/	100	0	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>S. marcescens</i>	/	/	100	50	100	100	100	50	0	100	100	0	100	/	100	0	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>S. fonticola</i>	/	/	100	0	100	100	100	100	0	100	100	0	100	/	100	0	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>S. odorifera</i>	/	/	100	100	100	100	100	100	0	100	100	0	100	/	0	0	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>Salmonella sp.</i>	/	/	20	0	0	0	0	45	0	100	100	0	100	/	100	100	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>C. freundii</i>	/	/	75	50	100	25	0	0	0	100	100	0	100	/	100	0	0	0	0	0	100	100	100	100	100	100
<i>P. aeruginosa</i>	/	/	/	/	35,94	/	/	28,13	92,19	62,5	53,13	31,25	/	39,07	20,31	10	0	50	54,68	57,81	81,25	84,37	82,81	65,62	68,75	67,18
<i>A. baumannii</i>	/	/	/	/	0	/	/	38,1	47,62	23,81	33,34	0	/	9,53	57,14	0	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100

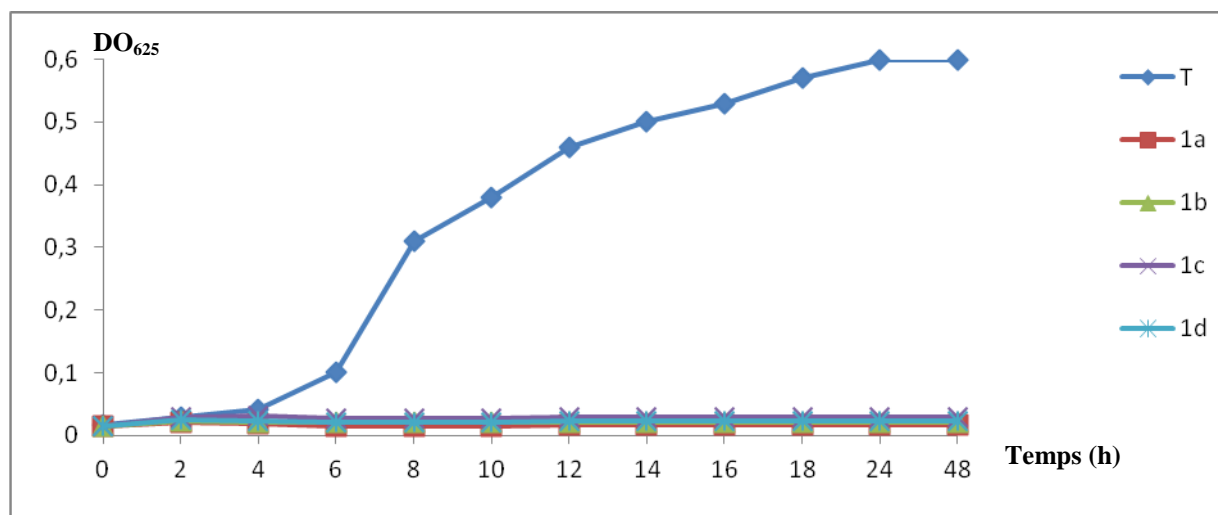
### 3.5. Détermination de la CMB :

Les molécules **1a-d** et **2a-f** ont été testées pour la CMB. La comparaison des dénombrements bactériens effectués avant et après incubation a permis de déterminer un nombre supérieur à  $10^2$  UFC/ml dans toutes les boîtes, ce qui correspond à un nombre supérieur à 0,01% par rapport au nombre initial de bactéries ; ceci indique que ces molécules possèdent une action bactériostatique et non pas bactéricide.

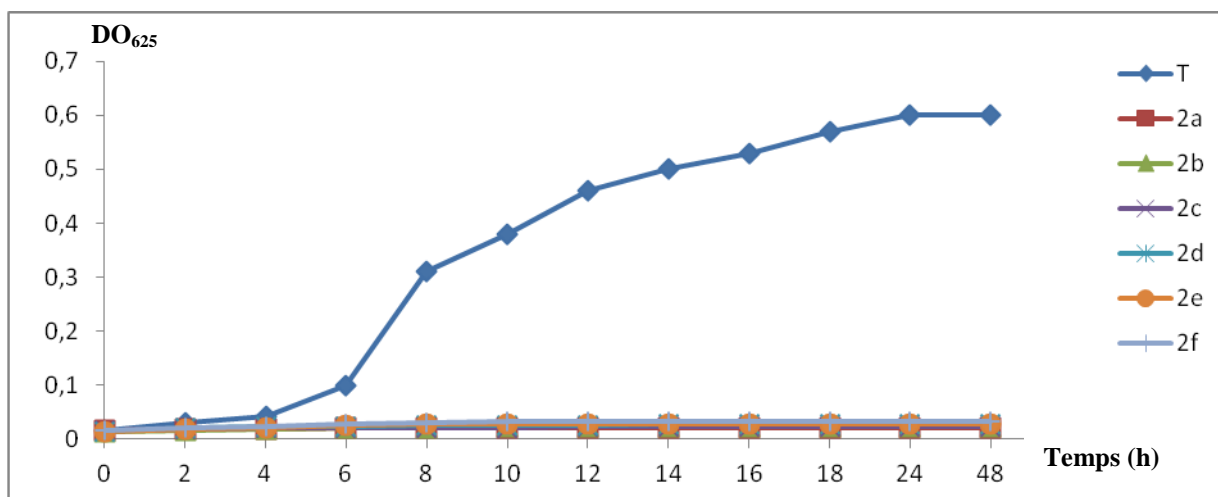
### 3.6. La cinétique :

La cinétique des CMI pendant 48 h nous a montré que l'inhibition des souches bactériennes par les deux séries de sulfamides **1a-d** et **2a-f** se produit dès les premières 4 heures d'incubation. La densité optique ( $DO_{625}$ ) a été faible et égal au taux d'ensemencement initial des souches bactériennes ( $DO_{625}$  à  $T_0$ ), par rapport au témoin (souche bactérienne sans traitement avec les sulfamides) qui a montré une croissance exponentielle.

Les Figures 27 et 28 illustrent, à titre d'exemple, la cinétique des souches de *S. aureus* vis-à-vis des deux séries de sulfamides testées.



**Figure 27 :** Cinétiques de la CMI des sulfamides testés **1a-d** vis-à-vis des souches de *S. aureus*.



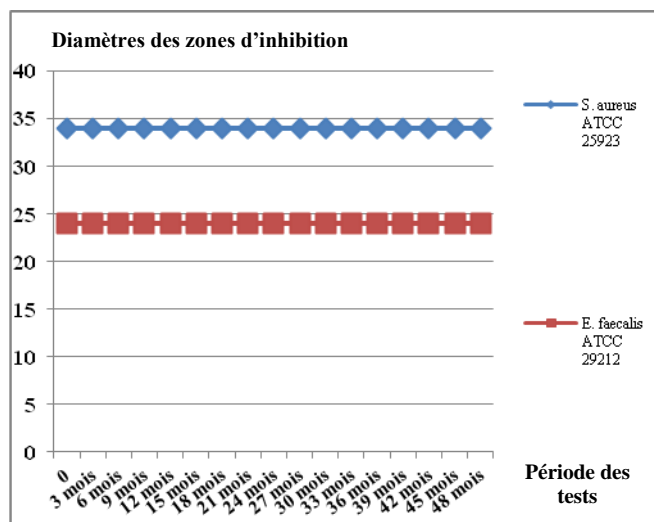
**Figure 28 :** Cinétiques de la CMI des sulfamides testés **2a-f** vis-à-vis des souches de *S. aureus*.

### 3.7. Evaluation de la stabilité structurale et de l'activité antibactérienne des deux séries de sulfamides 1a-d et 2a-f :

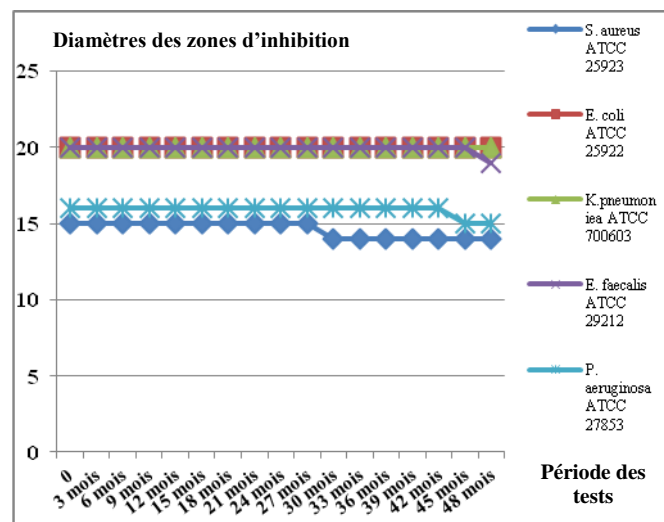
La synthèse chimique des sulfamides ayant fait l'objet de ce travail a été finalisée en Juin 2011. Ainsi, notre travail s'est étalé sur une période de 4 ans allant de Juin 2011 à Juin 2015.

Ces molécules ont été conservées à température ambiante, loin de la lumière et de l'humidité. Nous avons évalué la stabilité de ces molécules de sulfamides, périodiquement, tous les 3 mois sur les souches de références en mesurant les diamètres des zones d'inhibition, et ce, pendant toute la période de notre travail (4 ans).

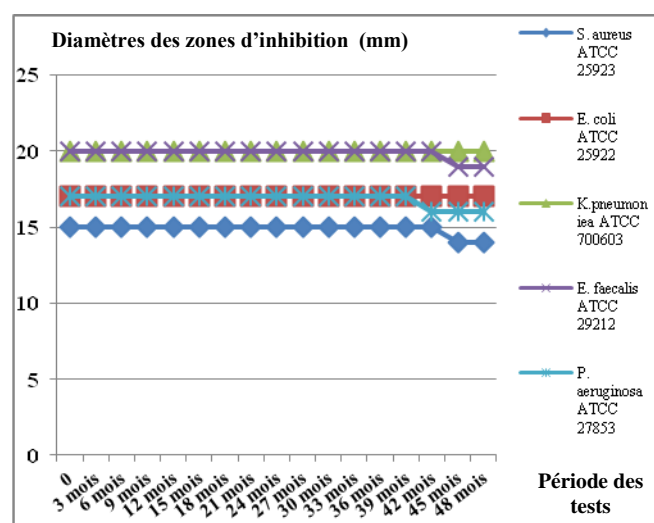
Une chromatographie sur couche mince (CCM) a été réalisée afin de confirmer la stabilité des molécules et mettre en évidence la conservation de la structure de ces dernières (Photo 25 et 26). Les résultats de la CCM obtenus montrent que les 10 molécules de sulfamides ne présentent aucune dégradation et ont conservé leurs structures initiales ; ceci est confirmé par l'apparition d'un seul spot de migration. Le test de l'activité antibactérienne sur les souches de références montre la conservation de l'activité antibactérienne durant 4 ans (Figure 29 et 30).



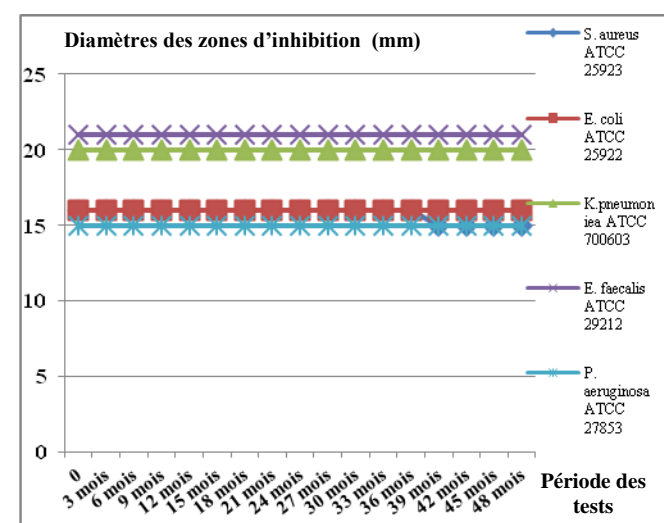
1a



1b

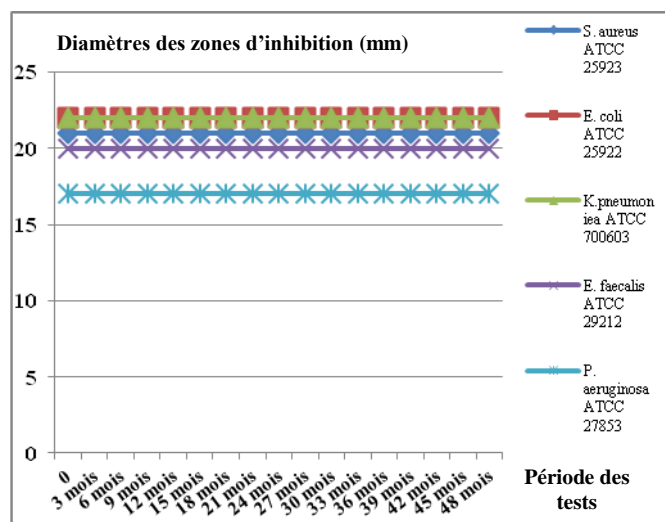


1c

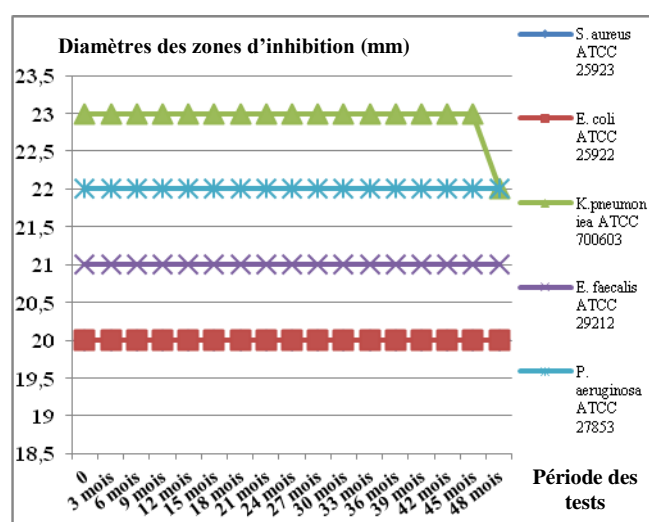


1d

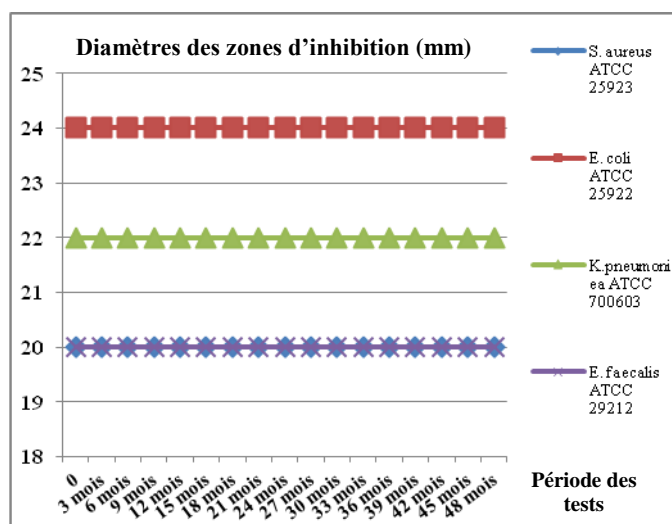
Figure 29 : Evaluation de la Stabilité des molécules 1a-d durant la période des tests.



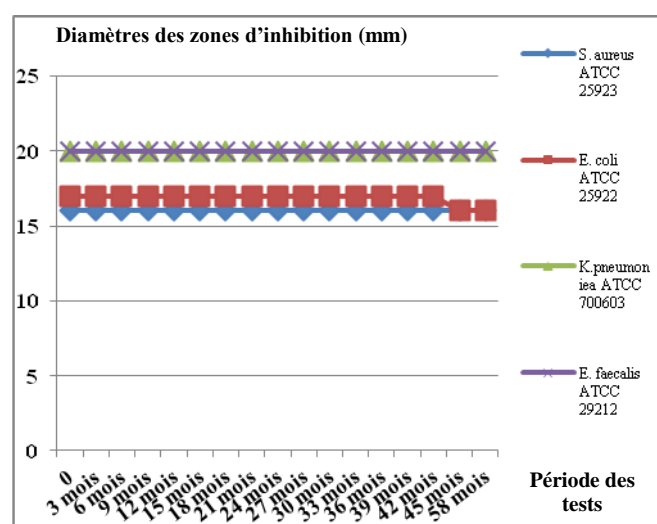
2a



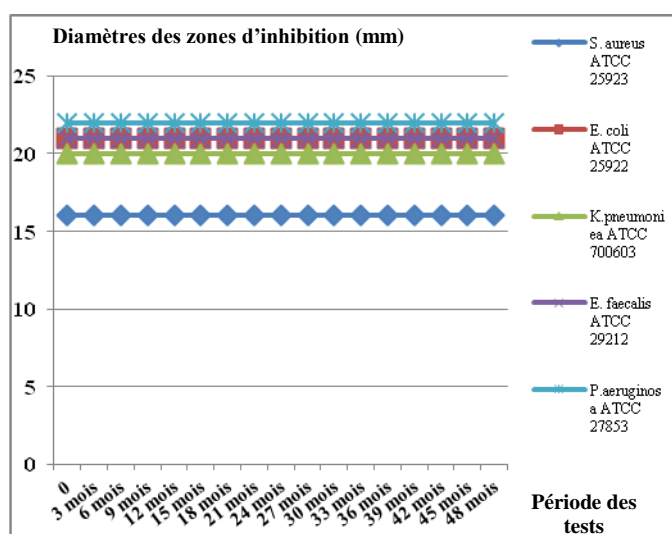
2b



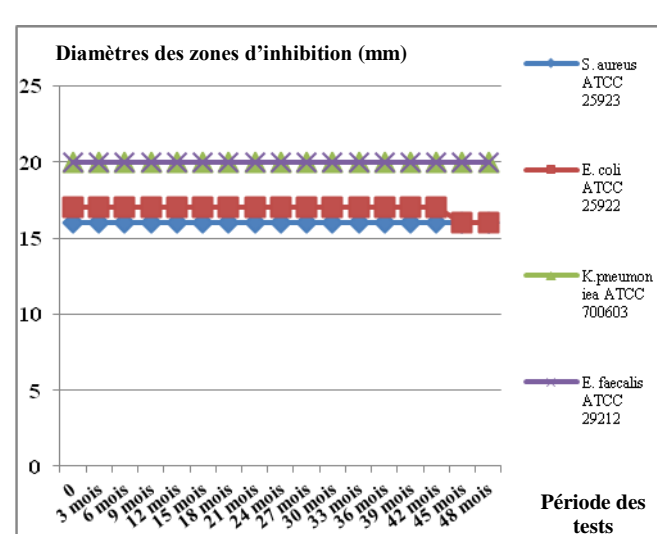
2c



2d



2e



2f

Figure 30 : Evaluation de la Stabilité des molécules 2a-f durant la période des tests

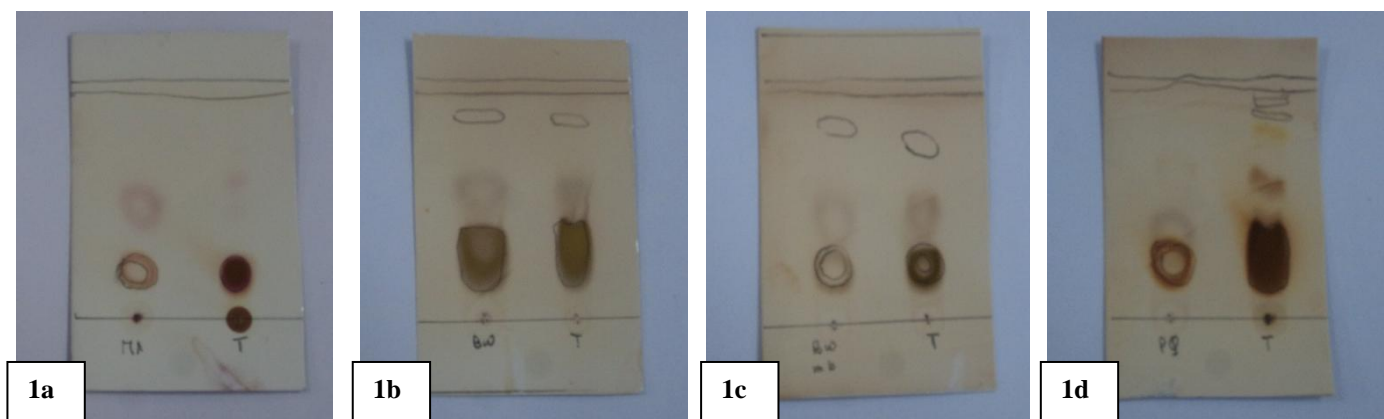


Photo 25 : Profil CCM des molécules de sulfamide 1a-d.

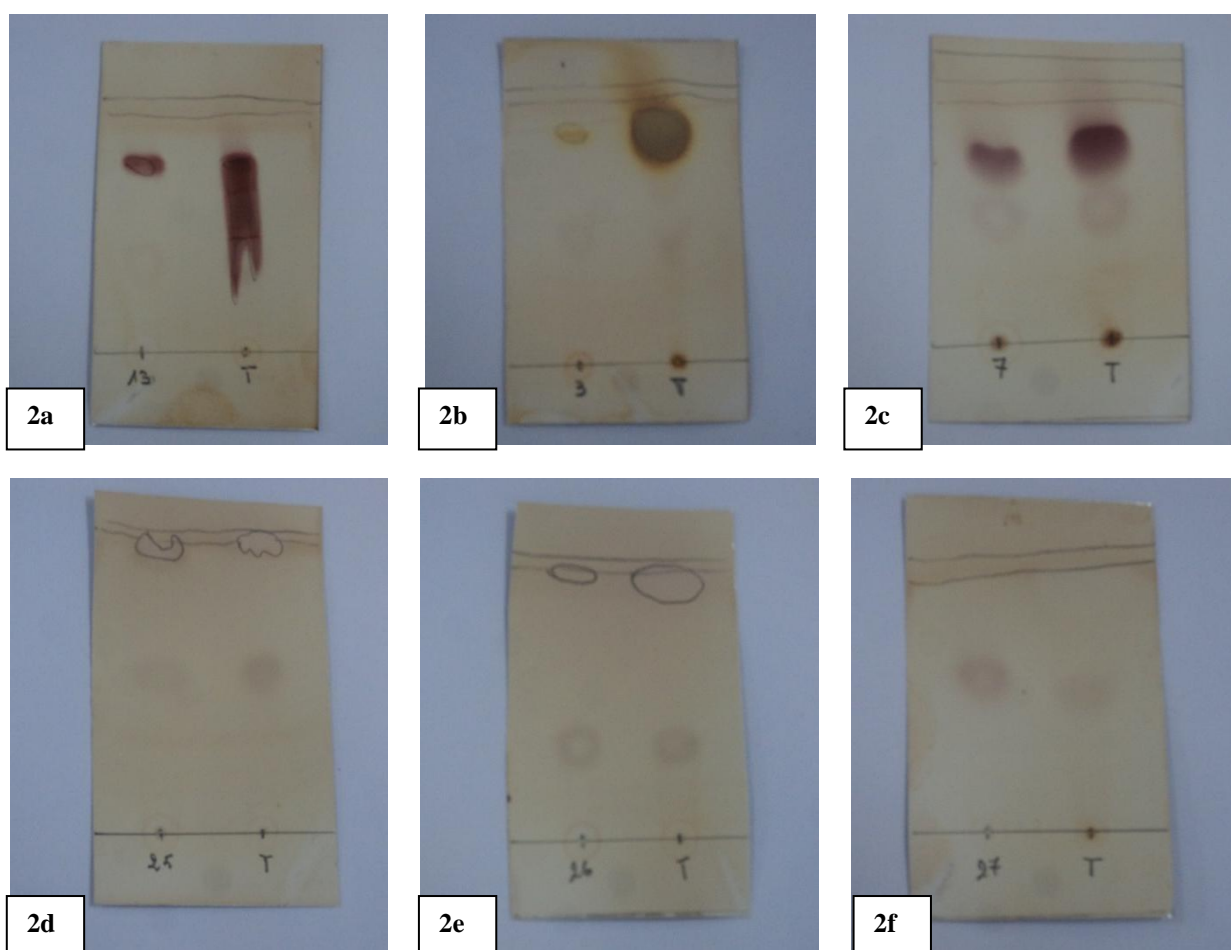


Photo 26 : Profil CCM des molécules de sulfamide 2a-f.

## **Conclusion 2 :**

Les résultats obtenus dans ce chapitre montrent que les deux séries de sulfamides **1a-d** et **2a-f** ont présenté une bonne activité antibactérienne avec des diamètres de zones d'inhibition et des CMI intéressantes vis-à-vis des souches cliniques testées à Gram positif et à Gram négatif, nosocomiales et communautaires.

Les CMI<sub>50</sub> et CMI<sub>90</sub> sont également faibles confirmant l'intérêt de ces molécules.

La CMB a confirmé l'effet bactériostatique attribué aux sulfamides.

En déterminant la cinétique d'action des molécules testées nous avons pu démontrer que le sulfamide agit dès son contact avec la bactérie et inhibe sa prolifération.

Nous avons également mis en évidence la conservation des molécules à long terme. En effet, les molécules sont bien conservées pendant une longue période (4 ans dans notre étude), à température ambiante, à l'abri de l'humidité et dans l'obscurité.

En ce qui concerne la série **1a-d**, la molécule **1a** n'a donné de résultats qu'avec les souches à Gram positif (*S. aureus* et *E. faecalis*). Une bonne activité antibactérienne a été obtenue avec la majorité des entérobactéries.

La deuxième série de sulfamide **2a-f** constituée de molécules linéaires et cycliques, a présenté une bonne activité antibactérienne avec la totalité des souches cliniques testées à Gram positif et à Gram négatif. Toutefois, les molécules linéaires ont montré de meilleurs résultats.

Les souches d'*E. faecalis* qui sont naturellement résistantes aux sulfamides, ont montré une bonne activité antibactérienne vis-à-vis des molécules testées.

Suite aux résultats intéressants et prometteurs obtenus quant à l'activité antibactérienne des molécules **1a-d** et **2a-f**, et afin de mieux caractériser leurs effets biologiques, quels seraient l'apport et l'importance de l'évaluation de leur potentiel cytotoxique sur un modèle biologique *in vitro* ?



#### 4. Evaluation de l'effet cytotoxique par le test de létalité sur *Artemia salina*:

Les deux séries de sulfamides **1a-d** et **2a-f** ont été testées pour leur effet cytotoxique sur les larves d'*A. salina* appelées nauplii (Figure 31).



**Figure 31** : Nauplii d'*Artemia salina* après éclosion (**Web 9**).

Après 24 heures de culture, le nombre des nauplii survivants est comptabilisé. Les pourcentages de mortalité sont calculés pour chaque concentration ainsi que pour le témoin négatif. La CL50 pour les molécules de sulfamides testées est déterminée à grâce au logiciel Prism 5.

Le test est validé lorsque la mortalité dans le lot témoin est inférieure à 5%. En cas de mortalité comprise entre 5% et 20%, le test est corrigé par la formule d'**Abbott (1925)**. Si la mortalité dans le lot témoin est supérieure à 20%, le test est à refaire.

Dans notre cas, nous avons obtenue un pourcentage de 3,33%, ce qui implique que notre test est valide sans avoir recours aux corrections.

Selon **Geran et al., 1972**, une molécule qui donne une CL50 supérieures à 20 µg/ml est considéré comme non toxique pour les nauplii d'*A. salina* et par conséquent aux cellules humaine.

Les résultats du test de cytotoxicité pour la première série de sulfamides **1a-d**, montrent que seule la molécule **1a** est cytotoxique vis-à-vis des nauplii d'*A. salina* avec une valeur de la CL50 égale à 18,29 µg/ml. Pour les molécules **1b**, **1c** et **1d** cette valeur est égale à 29,63, 66,01 et 20,99 µg/ml respectivement (Tableau 33).

Les résultats du test de cytotoxicité pour la deuxième série de sulfamides **2a-f** a montrent que toutes les molécules aussi bien linéaires que cycliques ne présentent aucun effet cytotoxique vis-à-vis des nauplii d'*A. salina*.

Les valeurs de la CL50 pour les molécules linéaires **2a-c** sont respectivement 892,3 ; 524,5 et 712,7 µg/ml. Ces valeurs sont très élevées et renseignent, parfaitement, sur le caractère non cytotoxique des molécules testées (Tableau 34).

Les valeurs de la CL50 pour les molécules cycliques **2d-f** sont respectivement 59,64 ; 142,3 et 292,3 µg/ml (Tableau 35).

**Tableau 33:** Evaluation de la cytotoxicité des molécules **1a-d** vis-à-vis d es nauplii d'*A. salina*.

Molécules testées	Concentrations (µg/ml)	Nombre initial de nauplii	Taux de léthalité			Taux de survivants			Pourcentage de mortalité	CL <sub>50</sub> (µg/ml)	Intervalle de confiance	
Série 1a-d	1a	512	10	9	9	10	1	1	0	93,33	18,29	13,44 à 24,91
		256	10	10	9	9	0	1	1	93,33		
		128	10	9	9	10	1	1	0	93,33		
		64	10	8	8	7	2	2	3	76,66		
		32	10	8	7	8	2	3	2	76,66		
		16	10	5	6	6	3	4	4	56,66		
		8	10	0	0	0	10	10	10	0		
		4	10	0	0	0	10	10	10	0		
		2	10	0	1	0	10	9	10	3,33		
		1	10	0	0	0	10	10	10	0		
	0,5	10	0	0	0	10	10	10	0			
	1b	512	10	10	10	10	0	0	0	100	29,63	25,58 à 34,46
		256	10	10	9	10	0	1	0	96,66		
		128	10	9	9	9	1	1	1	90		
		64	10	8	8	7	2	2	3	76,66		
		32	10	6	6	6	4	4	4	60		
		16	10	3	2	2	7	8	8	23,33		
		8	10	0	0	0	10	10	10	0		
		4	10	0	0	0	10	10	10	0		
		2	10	1	1	0	9	9	10	6,66		
		1	10	0	0	0	10	10	10	0		
	0,5	10	0	0	0	10	10	10	0			
	1c	512	10	7	8	9	3	8	9	80	66,1	48,45 à 89,95
		256	10	9	6	9	1	4	1	80		
		128	10	8	7	9	2	3	1	80		
		64	10	5	6	7	5	4	3	60		
		32	10	0	1	2	10	9	8	10		
		16	10	1	0	0	9	10	10	3,33		
		8	10	0	0	0	10	10	10	0		
		4	10	0	0	0	10	10	10	0		
2		10	0	0	0	10	10	10	0			
1		10	0	0	0	10	10	10	0			
0,5	10	0	0	0	10	10	10	0				
1d	512	10	10	10	10	0	0	0	100	20,99	18,35 à 24	
	256	10	10	9	10	0	1	0	96,66			
	128	10	10	10	9	0	0	0	96,66			
	64	10	9	8	9	1	2	1	86,66			
	32	10	6	7	6	4	3	4	63,33			
	16	10	5	6	5	5	4	5	36,66			
	8	10	3	2	3	7	8	7	26,66			
	4	10	1	0	0	9	10	10	3,33			
	2	10	0	0	0	10	10	10	0			
	1	10	0	0	0	10	10	10	0			
T	0,5	10	0	0	0	10	10	10	0			
	/	<b>10</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>9</b>	<b>3,33</b>			

**Tableau 34** : Evaluation de la cycotoxicité des molécules **2a-c** vis-à-vis des nauplii d'*A. salina*.

Molécules testées		Concentrations (µg/ml)	Nombre initial de nauplii	Taux de léthalité			Taux de survivants			Pourcentage de mortalité	CL <sub>50</sub> (µg/ml)	Intervalle de confiance
Série 2a-c	2a	512	10	5	3	3	5	7	7	36,66	892,3	550,2 à 1447
		256	10	4	3	3	6	7	7	33,33		
		128	10	2	3	0	8	7	10	16,66		
		64	10	2	1	2	8	9	8	16,66		
		32	10	1	1	1	9	9	9	10		
		16	10	0	0	0	10	10	10	0		
		8	10	0	0	0	10	10	10	0		
		4	10	0	0	0	10	10	10	0		
		2	10	0	0	0	10	10	10	0		
		1	10	0	0	0	10	10	10	0		
	0,5	10	0	0	0	10	10	10	0			
	512	10	4	5	5	6	5	5	46,66			
	256	10	5	4	2	5	6	8	36,66			
	128	10	4	3	4	6	7	6	36,66			
	64	10	4	3	3	6	7	7	33,33			
	32	10	2	3	1	8	7	9	16,66			
	16	10	2	2	2	8	8	8	16,66			
	8	10	2	1	0	8	9	10	10			
	4	10	0	1	0	10	9	10	3,33			
	2	10	0	0	0	10	10	10	0			
	1	10	0	0	0	10	10	10	0			
	0,5	10	0	0	0	10	10	10	0			
	512	10	5	4	5	5	6	5	46,66			
	256	10	4	4	4	6	6	6	40			
	128	10	3	4	3	7	6	7	23,33			
	64	10	3	2	3	7	8	7	26,66			
	32	10	3	2	2	7	8	7	23,33			
	16	10	3	2	0	7	8	10	23,33			
	8	10	2	2	1	8	8	9	16,66			
	4	10	0	0	0	10	10	10	0			
2	10	1	0	1	9	10	9	6,66				
1	10	0	0	0	10	10	10	0				
0,5	10	0	0	0	10	10	10	0				
T	/	10	0	0	1	10	10	9	3,33	712,7	289,7 à 1753	

**Tableau 35** : Evaluation de la cytotoxicité des molécules **2d-f** vis-à-vis des nauplii d'*A. salina*.

Molécules testées		Concentrations (µg/ml)	Nombre initial de nauplii	Taux de léthalité			Taux de survivants			Pourcentage de mortalité	CL <sub>50</sub> (µg/ml)	Intervalle de confiance
Série 2d-f	2d	512	10	7	7	9	3	1	2	80	59,64	40,31 à 88,25
		256	10	7	6	7	7	4	3	66,66		
		128	10	7	5	6	3	5	4	60		
		64	10	6	6	6	4	4	4	60		
		32	10	5	4	3	5	6	7	40		
		16	10	5	3	3	5	7	7	36,66		
		8	10	2	2	2	8	8	8	20		
		4	10	0	0	0	10	10	10	0		
		2	10	1	2	0	9	8	10	10		
		1	10	0	0	0	10	10	10	0		
	0,5	10	0	0	0	10	10	10	0			
	2e	512	10	8	8	8	0	0	0	80		
		256	10	7	7	8	3	3	2	73,33		
		128	10	5	4	4	5	6	6	43,33		
		64	10	3	1	2	7	9	8	30		
		32	10	1	2	0	9	8	10	10		
		16	10	0	0	0	10	10	10	0		
		8	10	0	0	0	10	10	10	0		
		4	10	0	1	0	10	9	10	3,33		
		2	10	0	0	0	10	10	10	0		
		1	10	0	0	0	10	10	10	0		
	0,5	10	0	0	0	10	10	10	0			
	2f	512	10	7	6	7	3	4	3	66,66		
		256	10	5	6	5	5	4	5	53,33		
		128	10	1	1	2	9	9	8	13,33		
		64	10	1	1	1	9	9	9	10		
		32	10	2	0	0	8	10	10	6,66		
		16	10	0	0	0	10	10	10	0		
		8	10	0	0	1	10	10	9	3,33		
		4	10	0	0	0	10	10	10	0		
2		10	1	0	0	9	10	10	3,33			
1		10	0	0	0	10	10	10	0			
0,5	10	0	0	0	10	10	10	0				
T	/	10	0	0	1	10	10	9	3,33			

### **Conclusion 3 :**

L'intérêt de l'évaluation de l'effet cytotoxique des molécules de sulfamides testées sur les nauplii d'*A. salina* est de démontrer, éventuellement, leur toxicité par rapport aux cellules humaines.

Les résultats obtenus nous ont permis de mettre en évidence, au niveau de la première série de sulfamides **1a-d**, la toxicité de la molécule **1a**. Les molécules **1b-d** ne présentent aucune toxicité.

Les molécules de la série **2a-f** linéaires et cycliques, ne présentent aucun effet cytotoxique.

L'évaluation de la cytotoxicité des molécules de sulfamides suffit-elle à elle seule de conclure sur la toxicité ou non des molécules ? Ne serait-il pas plus adapté, voire nécessaire, d'évaluer également le potentiel génotoxique des sulfamides testés, par des tests conventionnels, tels que le test d'Ames et le SOS Chromotest, et permettre ainsi d'évaluer les risques au niveau moléculaire (mutations de l'ADN) ?

## 5. Evaluation de l'effet génotoxique :

### 5.1. Le test d'Ames :

L'évaluation de l'effet génotoxique des différentes molécules de sulfamides sur les souches de *Salmonella typhimurium* TA98, TA100 et TA1535 a été réalisée selon Ames (1973). La lecture des résultats a été faite en comparant le nombre de colonies révertantes, en présence et en absence d'activation métabolique (S9), aux témoins (Annexe 3).

#### 5.1.1. Les tests de confirmation des caractères génétiques des souches de *S. typhimurium* :

##### a. Réclamation de l'histidine :

Après incubation, nous avons observé une croissance des souches sur les boîtes his/bio, contrairement aux boîtes contenant la biotine uniquement où on n'observe aucune croissance bactérienne excepté celle de la souche sauvage.

Ce résultat confirme la présence de la mutation *his-* (Photo 27).

##### b. La résistance à l'ampicilline et la sensibilité au cristal violet :

Après incubation des souches TA98 et TA100, nous avons observé une zone d'inhibition autour du disque imbibé de cristal violet. Ces souches sont donc porteuses de la mutation *rfa-* (le cristal violet a traversé la membrane de ces souches d'où la formation de la zone d'inhibition), et du plasmide PKM101 qui porte le gène de résistance à l'ampicilline (Photos 28 et 29).

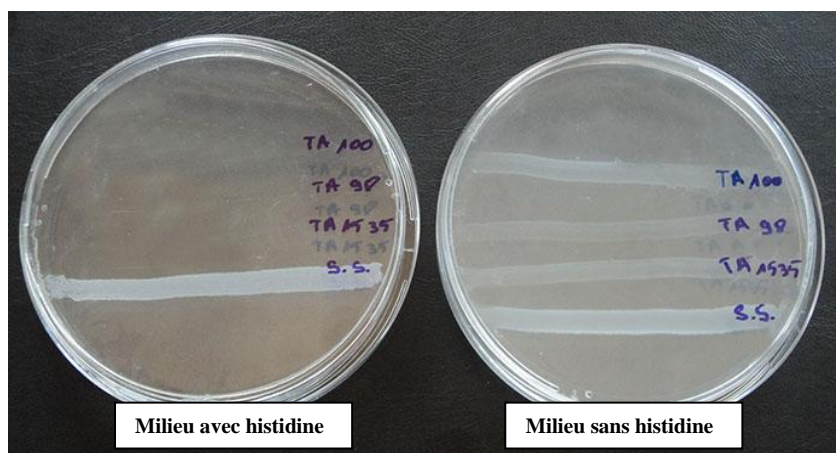
D'autre part, nous avons observé une zone d'inhibition autour des disques imbibés de cristal violet et d'ampicilline pour la souche TA1535 traduisant la présence de la mutation *rfa-* et l'absence du plasmide PKM101 qui porte le gène de résistance à l'ampicilline (Photo 30).

La souche sauvage a montré l'absence de zones d'inhibitions ; elle possède le gène *rfa+*, ainsi que le plasmide PKM101 qui lui confère la résistance à l'ampicilline.

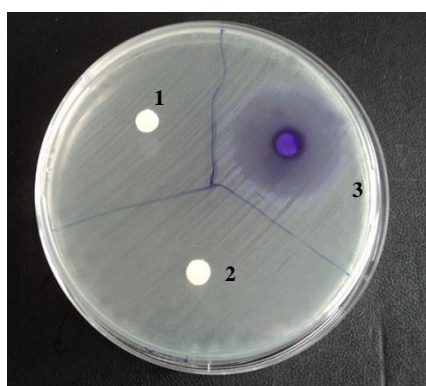
##### c. La sensibilité aux UV :

Contrairement à la souche sauvage, les souches de *S. typhimurium* TA98, TA100, et TA1535 ont été sensibles à l'exposition aux UV. Cette sensibilité se manifeste par une absence de croissance dans la partie de la boîte exposée aux UV (Photos 31 et 32).

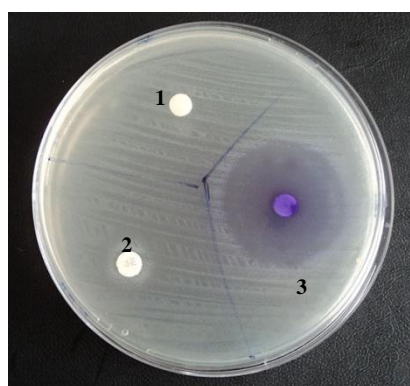
La croissance de la souche sauvage dans la totalité de la boîte se traduit par la présence du système de réparation par excision chez cette dernière et son absence chez les souches mutées du test d'Ames (gènes *uvrA*, *uvrB* et *uvrC*).



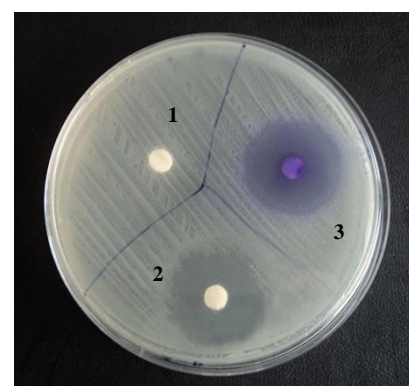
**Photo 27 :** Test de la réclamation de l'histidine des souches TA100, TA98, TA1535 et de la souche sauvage *Salmonella sp.*



**Photo 28 :** Test de la résistance à l'ampicilline et de la sensibilité au cristal violet de la souche TA100.

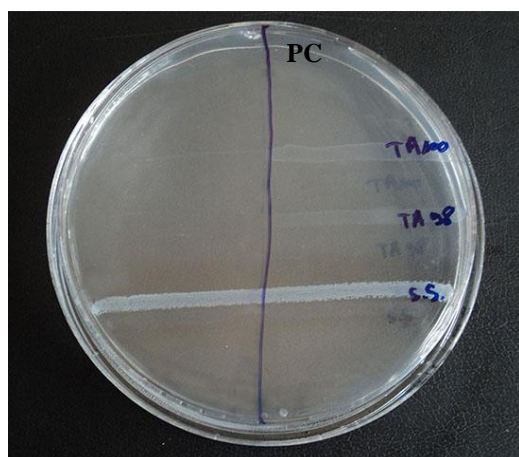


**Photo 29 :** Test de la résistance à l'ampicilline et de la sensibilité au cristal violet de la souche TA98.

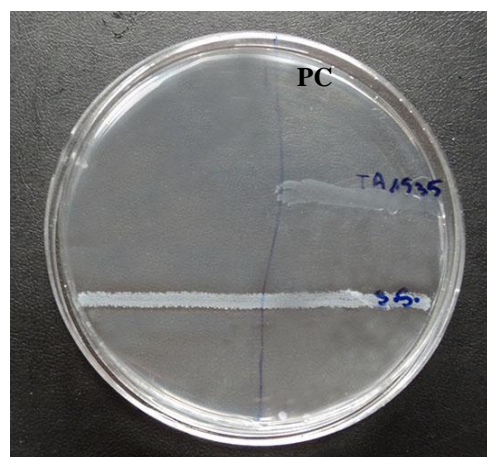


**Photo 30 :** Test de la résistance à l'ampicilline et de la sensibilité au cristal violet de la souche TA1535.

- 1 : Eau distillée stérile.
- 2 : Ampicilline.
- 3 : Cristal violet.



**Photo 31 :** Test de la sensibilité aux UV des souches TA100, TA98 et de la souche sauvage de *Salmonella sp.*



**Photo 32 :** Test de la sensibilité aux UV de la souche TA1535 et de la souche sauvage de *Salmonella sp.*

- SS : Souche sauvage de *Salmonelle*.
- PC : Partie cachée.



**5.1.2. Evaluation de l'effet génotoxique de la série de sulfamides 1a-d :**

**a. Evaluation de l'effet génotoxique de la molécule 1a :**

La molécule **1a** [(N-(4-méthoxyphényl) sulfamide)], a montré un effet génotoxique vis-à-vis de la souche TA100 avec et sans activation métabolique (S9). Un grand nombre de colonies révertantes a été observé avec la totalité des concentrations. Sans activation métabolique, les valeurs varient entre  $922 \pm 5,5$  (concentration 0,5 µg/ml) et  $7232 \pm 10,14$  (concentration 512 µg/ml). Avec activation métabolique, le nombre de colonies révertantes est plus important, il varie entre  $1910,33 \pm 15$  (concentration 0,5 µg/ml) et  $8871 \pm 10,53$  (concentration 512 µg/ml) (Tableau 36), (Figure 32), (Photos 33, 34 et 35).

Cette molécule a exprimé un effet génotoxique en induisant une mutation de type substitution de paires de bases.

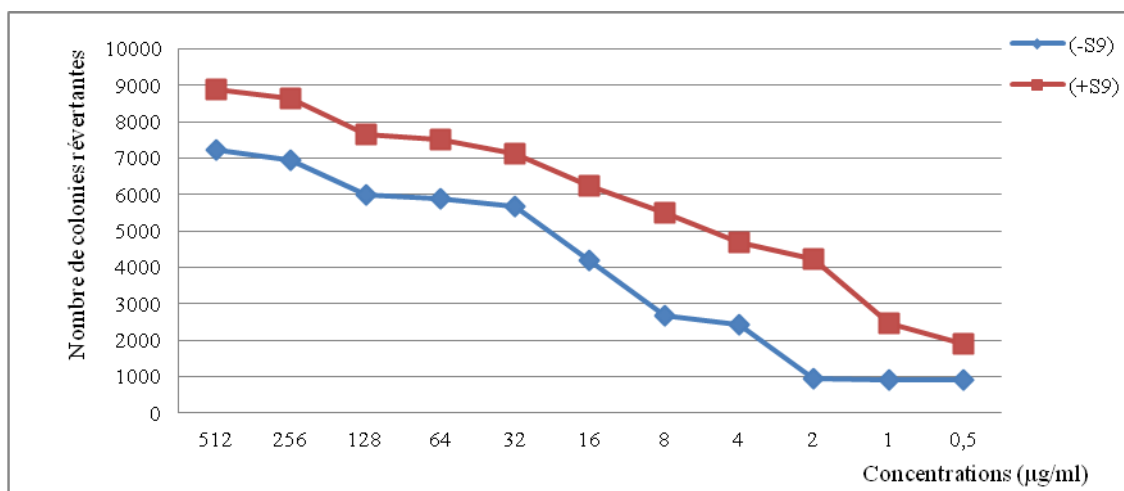
Les souches TA98 et TA1535 n'ont pas exprimé de génotoxicité.

**Tableau 36 :** Dénombrement des colonies révertantes des souches de *S. typhimurium* TA100, TA98 et TA1535 vis-à-vis de la molécule **1a** avec et sans activation métabolique (S9).

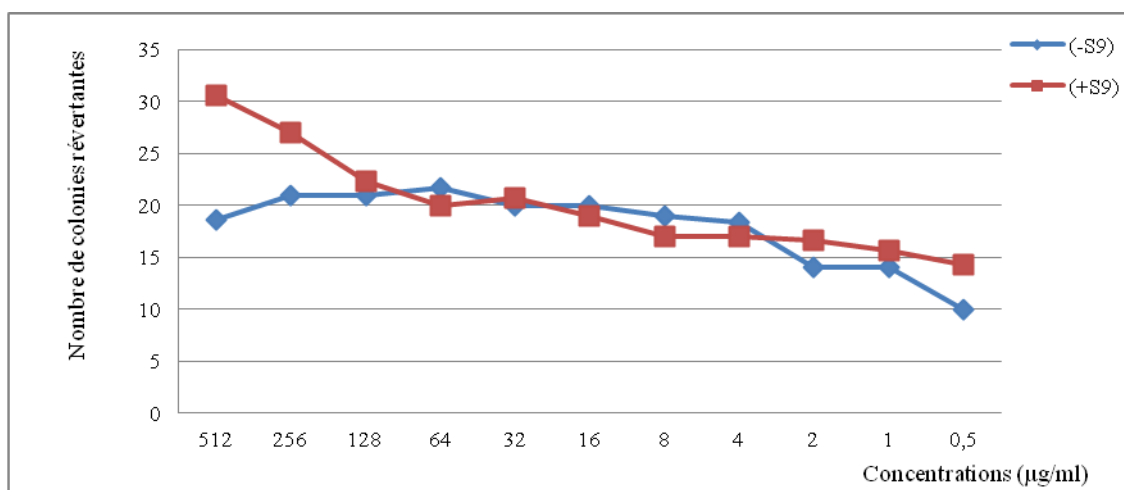
Concentrations (µg/ml)	TA 100		TA 98		TA 1535	
	(-S9)	(+S9)	(-S9)	(+S9)	(-S9)	(+S9)
512	7232 ± 10,14	8871 ± 10,53	18,66 ± 1,15	30,66 ± 0,57	58,33 ± 1,52	60,66 ± 1,15
256	6939,66 ± 13,57	8646 ± 11,59	21 ± 1	27 ± 1	58,33 ± 0,57	56 ± 1
128	5997 ± 2,64	7653 ± 10,53	21 ± 1	22,33 ± 0,57	56,66 ± 1,15	56,33 ± 2,08
64	5872,33 ± 11,59	7498,33 ± 9,86	21,66 ± 1,52	20 ± 0	55,33 ± 1,15	50 ± 1
32	5673 ± 10,53	7133 ± 12,12	20 ± 0	20,66 ± 0,57	53 ± 1	51 ± 1
16	4190,33 ± 5,5	6231 ± 11,53	20 ± 1	19 ± 1	51 ± 1	47,66 ± 0,57
8	2664 ± 8,71	5479,66 ± 10,52	19 ± 1	17 ± 1	50 ± 0	45,66 ± 0,57
4	2432,33 ± 9,60	4671,66 ± 11,59	18,33 ± 1,15	17 ± 1	50 ± 1	43 ± 1
2	945,66 ± 9,01	4215 ± 5,5	14 ± 1	16,66 ± 1,15	43,33 ± 1,15	41 ± 1
1	920,33 ± 5,5	2453 ± 10	14 ± 1	15,66 ± 1,15	39,66 ± 0,57	39 ± 1
0,5	922 ± 5,5	1910,33 ± 15	10 ± 0	14,33 ± 0,57	35 ± 1	36 ± 1

(-S9) : sans activation métabolique.

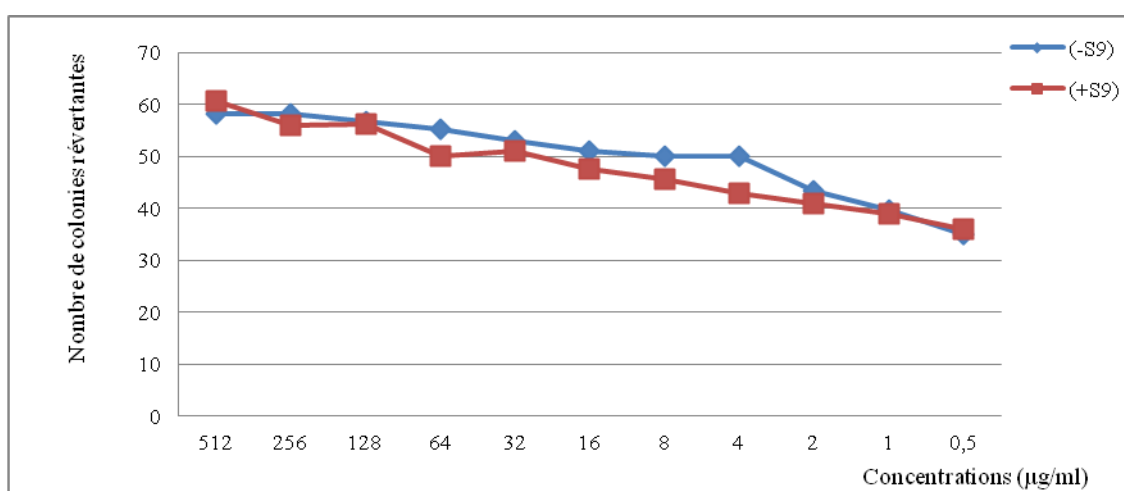
(+S9) : avec activation métabolique.



(a)

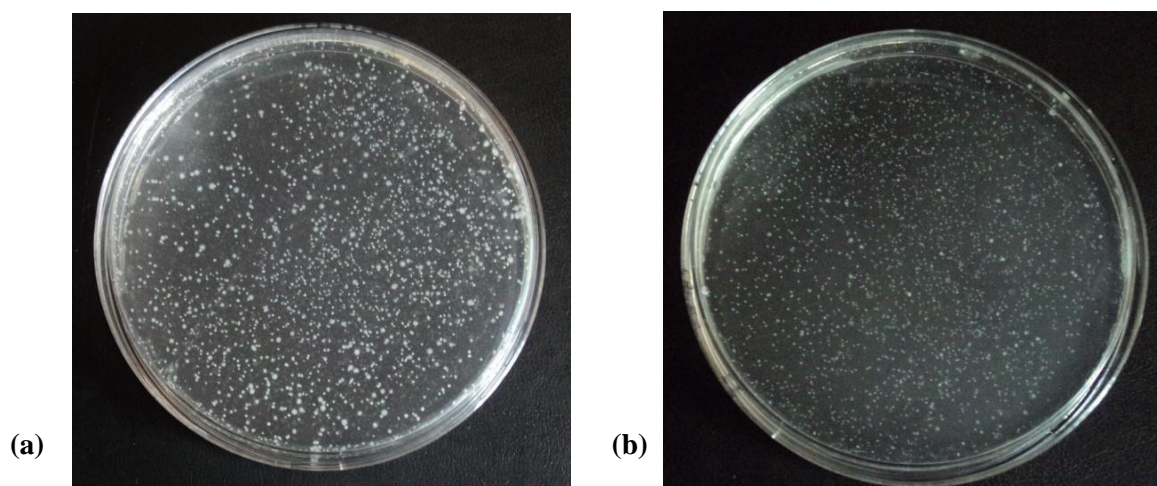


(b)

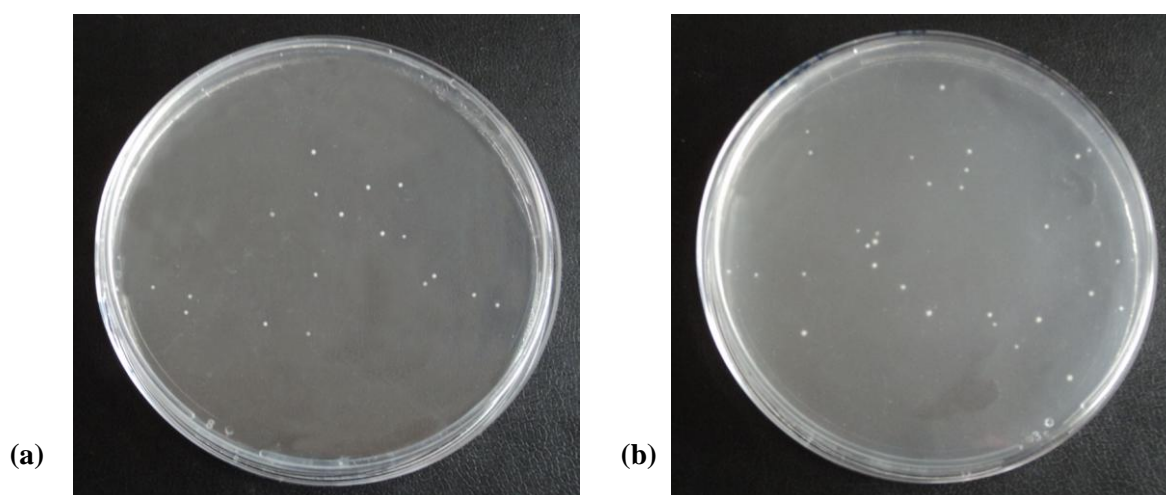


(c)

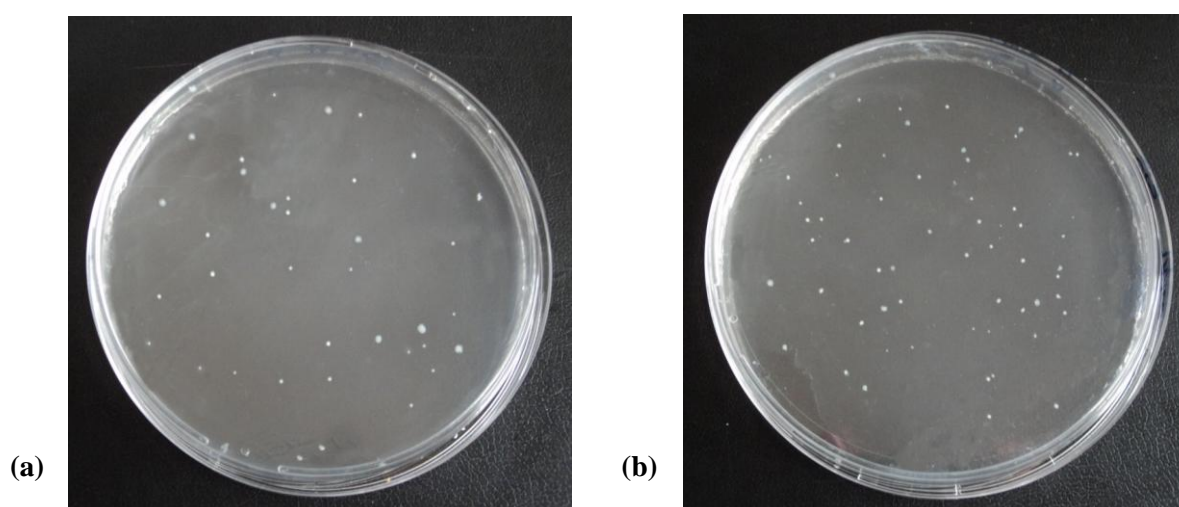
Figure 32 : Nombre de colonies révertantes des souches TA100 (a), TA98 (b) et TA1535 (c) en présence de la molécule 1a, avec et sans activation métabolique (S9).



**Photo 33** : Nombre de colonies révertantes de la souche **TA100** à concentration 512  $\mu\text{g/ml}$  de la molécule **1a**, sans (a) et avec activation métabolique (b).



**Photo 34** : Nombre de colonies révertantes de la souche **TA98** à concentration 512  $\mu\text{g/ml}$  de la molécule **1a**, sans (a) et avec activation métabolique (b).



**Photo 35** : Nombre de colonies révertantes de la souche **TA1535** à concentration 512  $\mu\text{g/ml}$  de la molécule **1a**, sans (a) et avec activation métabolique (b).

**b. Evaluation de l'effet génotoxique de la molécule 1b :**

La molécule **1b** [(N-(3-fluorophenyl) sulfamide], a montré un effet génotoxique vis-à-vis de la souche TA1535 avec et sans activation métabolique. Le nombre de colonies révertantes varie entre  $617 \pm 10$  (concentration 0,5  $\mu\text{g/ml}$ ) et  $1392,66 \pm 11,52$  (concentration 512  $\mu\text{g/ml}$ ) sans activation métabolique.

Avec activation métabolique, le nombre varie entre  $1457 \pm 20$  (concentration 0,5  $\mu\text{g/ml}$ ) et  $3211,33 \pm 17,52$  (concentration 512  $\mu\text{g/ml}$ ) (Tableau 37), (Figure 33).

Cette molécule a exprimé un effet génotoxique en induisant une mutation de type substitution de paires de bases.

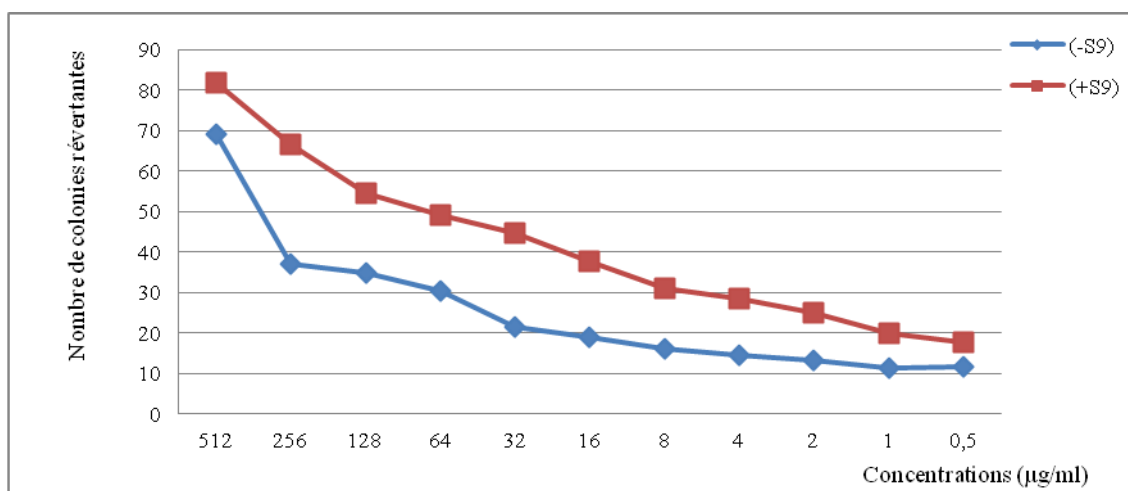
Les souches TA100 et TA98 ne montrent aucun effet génotoxique.

**Tableau 37 :** Dénombrement des colonies révertantes des souches de *S. typhimurium* **TA100**, **TA98** et **TA1535** vis-à-vis de la molécule **1b** avec et sans activation métabolique (S9).

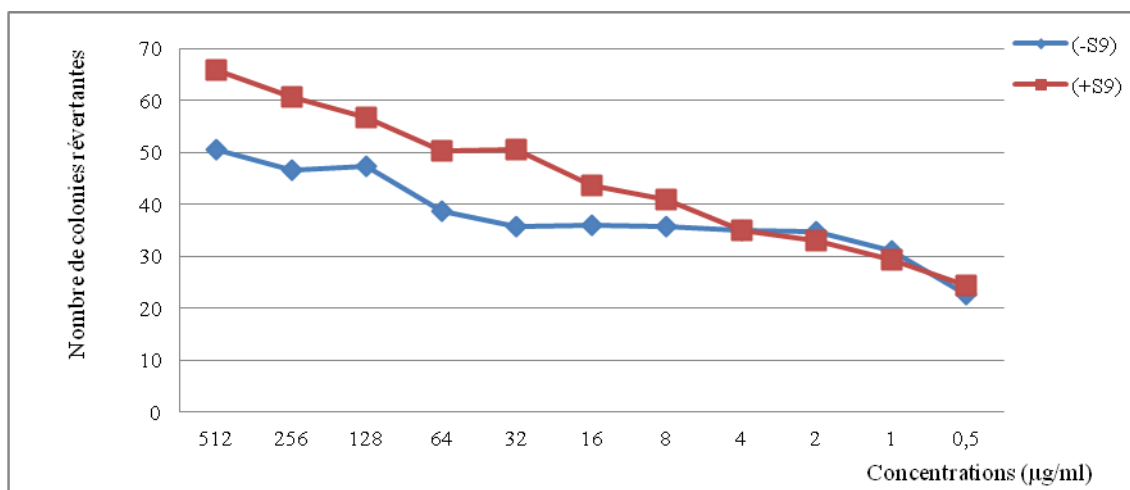
Concentrations ( $\mu\text{g/ml}$ )	TA 100		TA 98		TA 1535	
	(-S9)	(+S9)	(-S9)	(+S9)	(-S9)	(+S9)
<b>512</b>	$96,33 \pm 2,57$	$64,66 \pm 0,57$	$50,66 \pm 0,57$	$66 \pm 1$	$1392,66 \pm 1,52$	$3211,33 \pm 17,52$
<b>256</b>	$85,66 \pm 1,15$	$58,33 \pm 1,15$	$46,66 \pm 1,52$	$60,66 \pm 1,15$	$1281 \pm 10$	$3127,66 \pm 20,52$
<b>128</b>	$74,66 \pm 1,15$	$56 \pm 1$	$47,33 \pm 1,15$	$56,66 \pm 1,52$	$1017 \pm 13$	$2875,66 \pm 20,51$
<b>64</b>	$37,33 \pm 0,57$	$48 \pm 1$	$38,66 \pm 1,15$	$50,33 \pm 0,57$	$1016,66 \pm 5,52$	$2579,33 \pm 21,52$
<b>32</b>	$39,33 \pm 1,15$	$42,33 \pm 1,52$	$35,66 \pm 0$	$50,66 \pm 1,15$	$1001,66 \pm 10,52$	$2431,33 \pm 18,52$
<b>16</b>	$19 \pm 1$	$21 \pm 1$	$36 \pm 0,57$	$43,66 \pm 1$	$959,66 \pm 8,57$	$2400 \pm 21$
<b>8</b>	$19,66 \pm 0,57$	$19,66 \pm 0,57$	$35,66 \pm 1,15$	$41 \pm 0,57$	$805 \pm 10$	$2217,66 \pm 10,57$
<b>4</b>	$17 \pm 1$	$17 \pm 1$	$35 \pm 1$	$35 \pm 0$	$741,33 \pm 8,57$	$2110 \pm 14,5$
<b>2</b>	$10,33 \pm 0,57$	$13,66 \pm 0,57$	$34,66 \pm 0,57$	$33 \pm 1$	$706 \pm 10,5$	$1712 \pm 22,1$
<b>1</b>	$6,66 \pm 0,57$	$10,33 \pm 0,57$	$31 \pm 1$	$29,33 \pm 1,15$	$686,66 \pm 12,57$	$1561,66 \pm 10,57$
<b>0,5</b>	$4 \pm 0$	$8 \pm 0$	$22,66 \pm 0,57$	$24,33 \pm 0,57$	$617 \pm 10$	$1457 \pm 20$

(-S9) : sans activation métabolique.

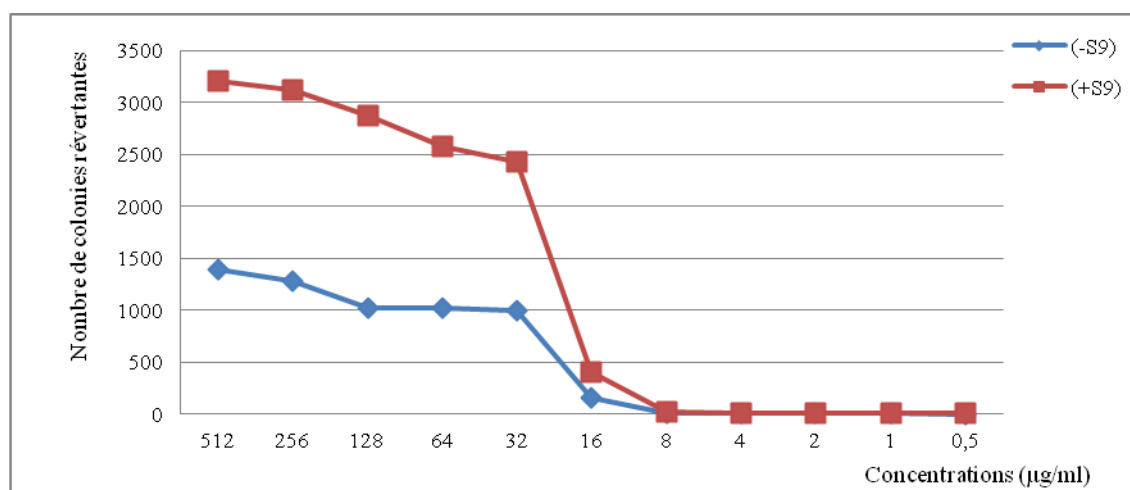
(+S9) : avec activation métabolique.



(a)



(b)



(c)

**Figure 33** : Nombre de colonies révertantes des souches TA100 (a), TA98 (b) et TA1535 (c) en présence de la molécule **1b**, avec et sans activation métabolique (S9).

*c. Evaluation de l'effet génotoxique de la molécule 1c :*

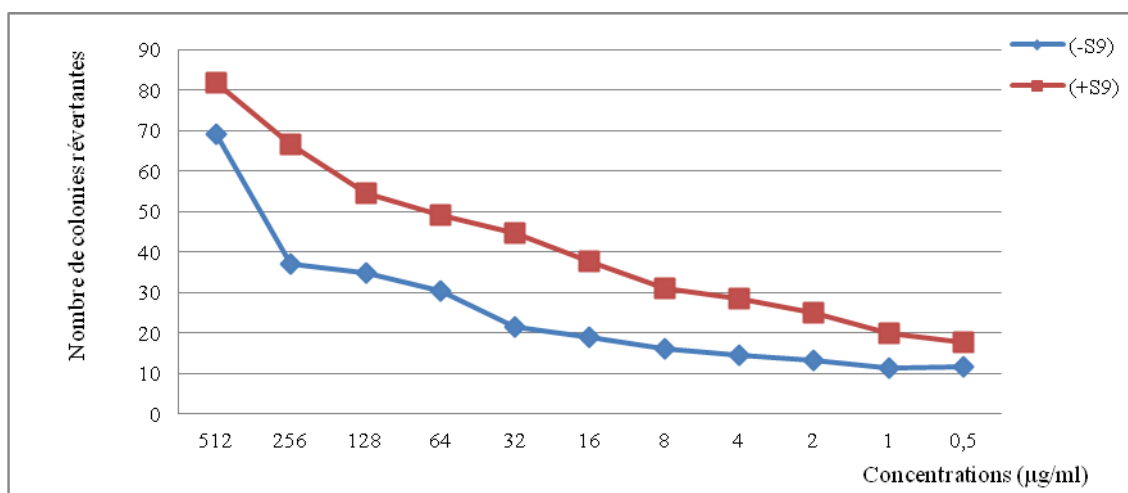
La molécule **1c** (N-(phenyl) sulfamide) ne montre aucun effet génotoxique avec les trois souches de *S. typhimurium* TA100, TA98 et TA1535 avec et sans activation métabolique. Le nombre de colonies révertantes est faibles avec toutes les souches et toutes les concentrations (Tableau 38), (Figure 34), (Photos 36, 37 et 38).

**Tableau 38** : Dénombrement des colonies révertantes des souches de *S. typhimurium* **TA100**, **TA98** et **TA1535** vis-à-vis de la molécule **1c** avec et sans activation métabolique (S9).

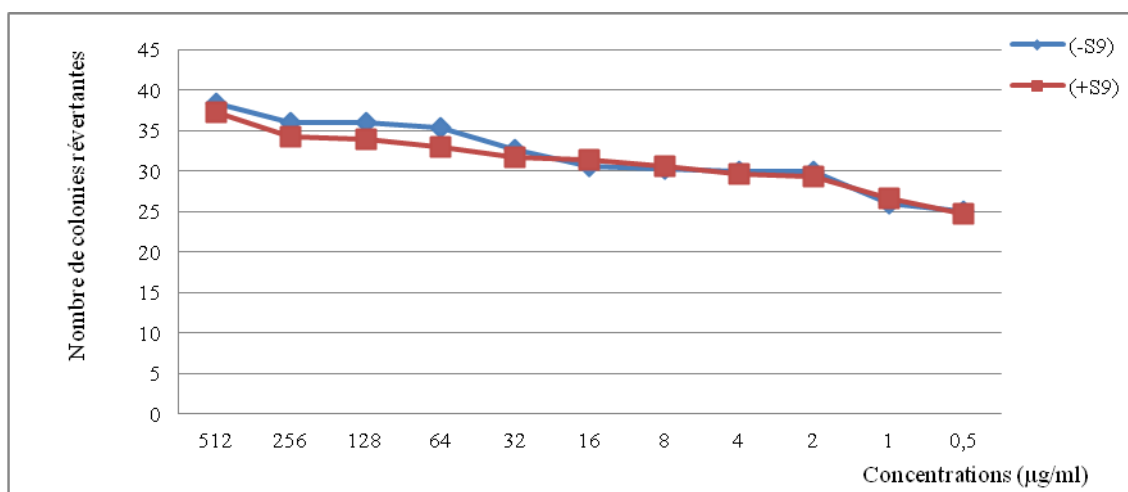
Souches bactériennes  Concentrations (µg/ml)	TA 100		TA 98		TA 1535	
	(-S9)	(+S9)	(-S9)	(+S9)	(-S9)	(+S9)
<b>512</b>	69 ± 1	82 ± 1	38,33 ± 0,57	37,33 ± 1,15	56,33 ± 1,15	56,33 ± 0,57
<b>256</b>	37 ± 1	66,66 ± 0,57	36 ± 1	34,33 ± 0,57	47,33 ± 0,57	55 ± 2
<b>128</b>	35 ± 1	54,66 ± 0,57	36 ± 1	34 ± 1	43,66 ± 1,52	53 ± 0
<b>64</b>	30,33 ± 0,57	49 ± 1	35,33 ± 1,15	33 ± 1	43 ± 1	47 ± 1
<b>32</b>	21,66 ± 1,52	44,66 ± 0,57	32,66 ± 1,15	31,66 ± 0,57	42,66 ± 1,15	44 ± 1
<b>16</b>	19 ± 1	37,66 ± 0,57	30,66 ± 1,15	31,33 ± 1,15	41,66 ± 1,52	42,66 ± 1,15
<b>8</b>	16 ± 0	31 ± 1	30,33 ± 0,57	30,66 ± 1,15	35,33 ± 1,15	41,33 ± 1,15
<b>4</b>	14,66 ± 0,57	28,66 ± 1,52	30 ± 0	29,66 ± 0,57	31,33 ± 1,15	34,33 ± 0,57
<b>2</b>	13,33 ± 1,15	25 ± 0	30 ± 1	29,33 ± 1,15	29,33 ± 1,15	32,66 ± 1,15
<b>1</b>	11,33 ± 1,15	20 ± 1	26 ± 1	26,66 ± 1,15	28,33 ± 1,52	30 ± 0
<b>0,5</b>	11,66 ± 1,52	17,66 ± 0,57	25 ± 1	24,66 ± 0,57	20 ± 0	23 ± 1

(-S9) : sans activation métabolique.

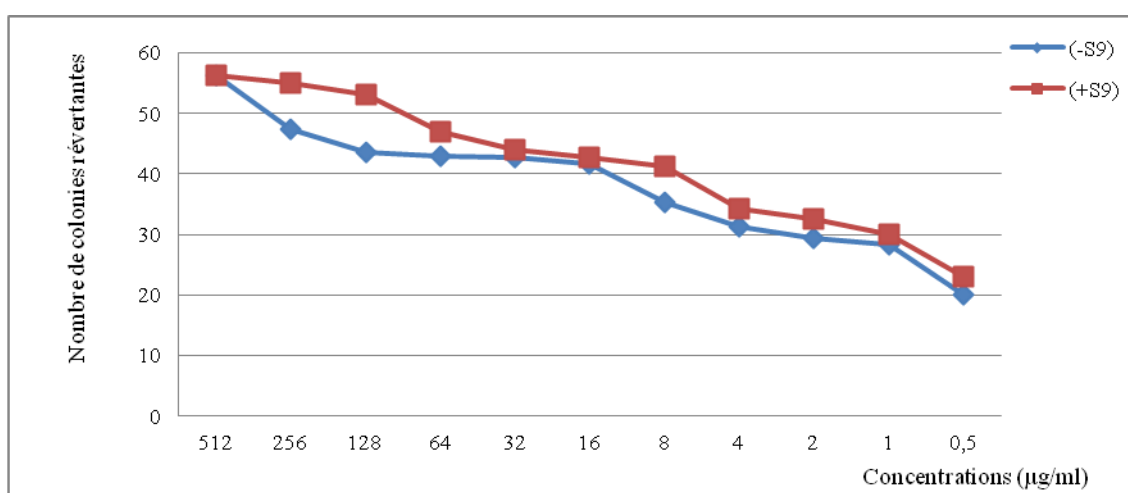
(+S9) : avec activation métabolique.



(a)

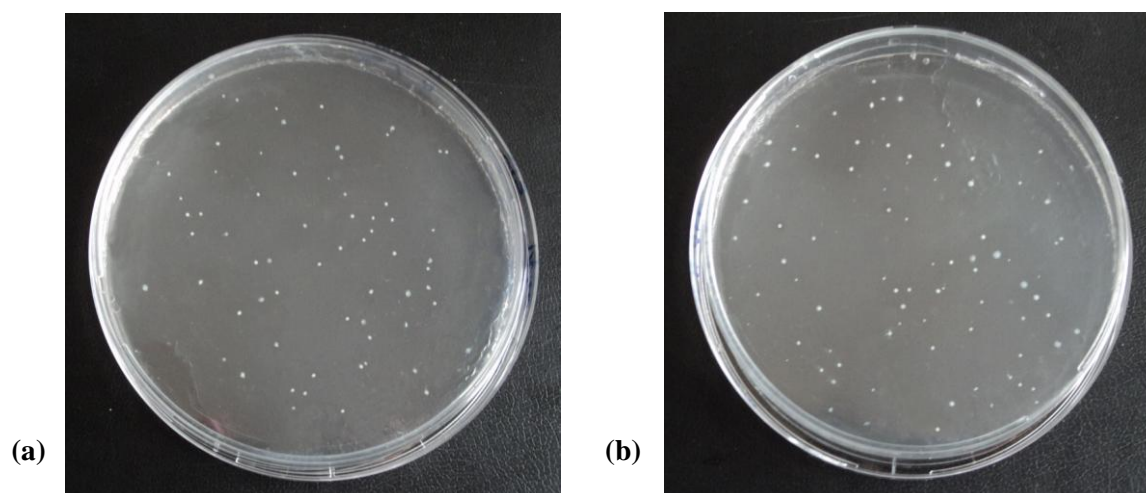


(b)

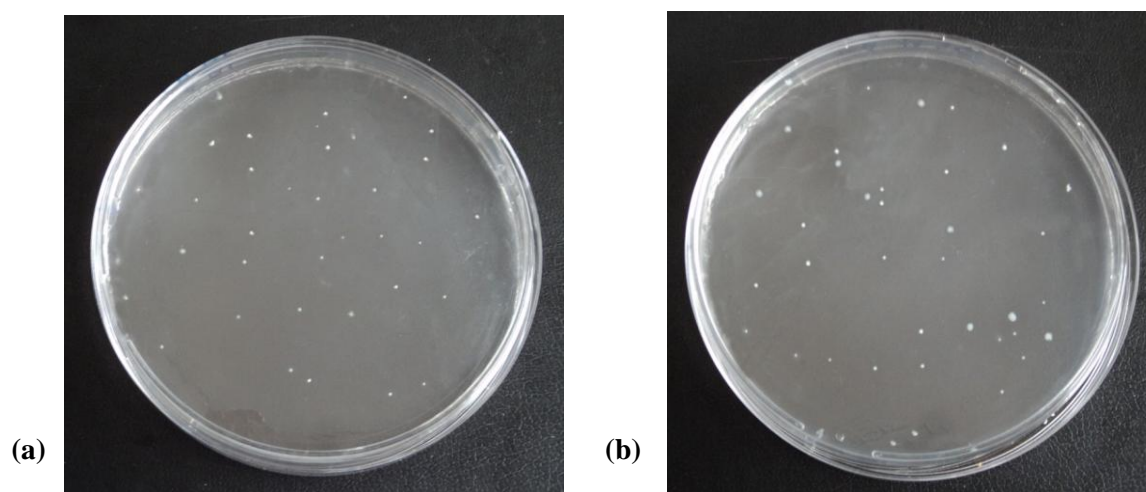


(c)

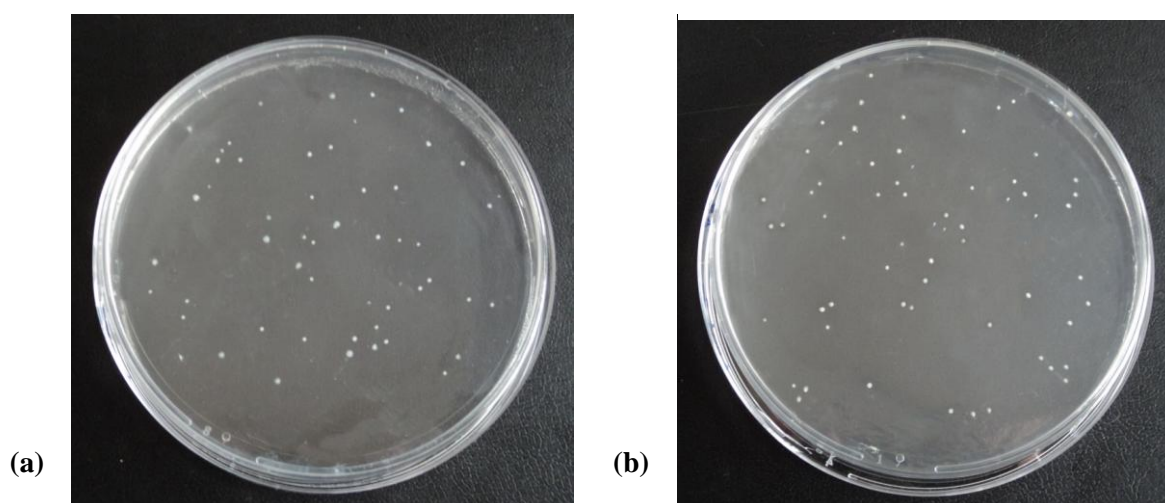
**Figure 34 :** Nombre de colonies révertantes des souches TA100 (a), TA98 (b) et TA1535 (c) en présence de la molécule 1c, avec et sans activation métabolique (S9).



**Photo 36 :** Nombre de colonies révertantes de la souche **TA100** à concentration 512 µg/ml de la molécule **1c**, sans (a) et avec activation métabolique (b).



**Photo 37 :** Nombre de colonies révertantes de la souche **TA98** à concentration 512 µg/ml de la molécule **1c**, sans (a) et avec activation métabolique (b).



**Photo 38 :** Nombre de colonies révertantes de la souche **TA1535** à concentration 512 µg/ml de la molécule **1c**, sans (a) et avec activation métabolique (b).



**d. Evaluation de l'effet génotoxique de la molécule 1d :**

La molécule **1d** [(N-(phenylethyl) sulfamide)], a montré un effet génotoxique avec les souches TA100 et TA1535 avec et sans activation métabolique.

Le nombre de colonies révetantes sans activation métabolique pour la souche TA100 varie entre  $586 \pm 5$  (concentration 0,5  $\mu\text{g/ml}$ ), et  $1873,66 \pm 21,52$  (concentration 512  $\mu\text{g/ml}$ ).

Avec activation métabolique, le nombre de colonies révertantes varie entre  $936,66 \pm 10,96$  (concentration 0,5  $\mu\text{g/ml}$ ) et  $4236,33 \pm 11,15$  (concentration 512  $\mu\text{g/ml}$ ).

Pour la souche TA1535 le nombre de colonies révertantes varie entre  $1127 \pm 12,52$  et  $5781,66 \pm 23,15$  pour les concentrations 0,5 et 512  $\mu\text{g/ml}$  respectivement sans activation métabolique. Avec activation métabolique, le nombre varie entre  $2342,33 \pm 10,52$  et  $8964 \pm 22$  pour le même intervalle de concentrations (Tableau 39), (Figure 35).

Aucun effet génotoxique n'est observé avec la souche TA98 avec et sans activation métabolique.

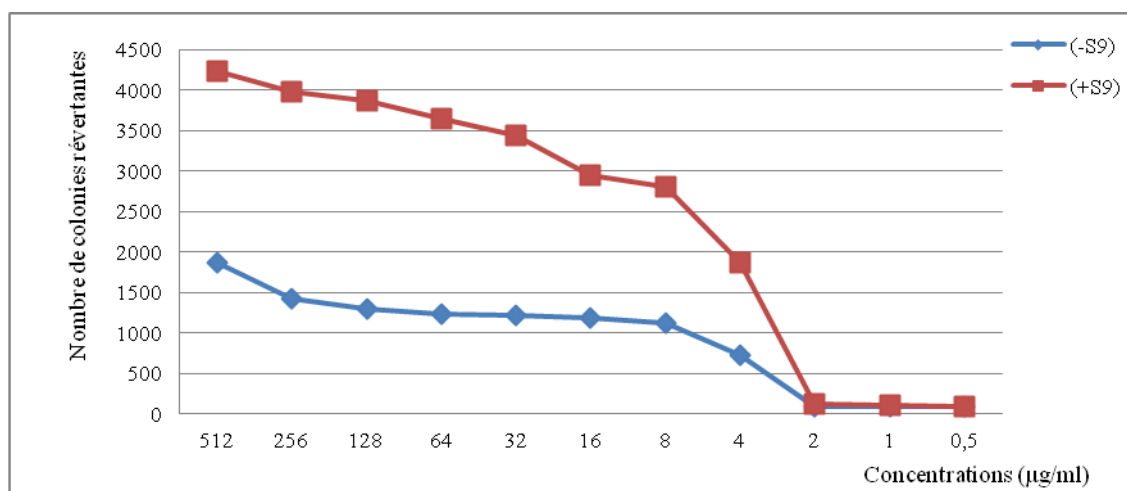
Cette molécule a exprimé un effet génotoxique en induisant une mutation de type substitution de paires de bases.

**Tableau 39 :** Dénombrement des colonies révertantes des souches de *S. typhimurium* **TA100**, **TA98** et **TA1535** vis-à-vis de la molécule **1d** avec et sans activation métabolique (S9).

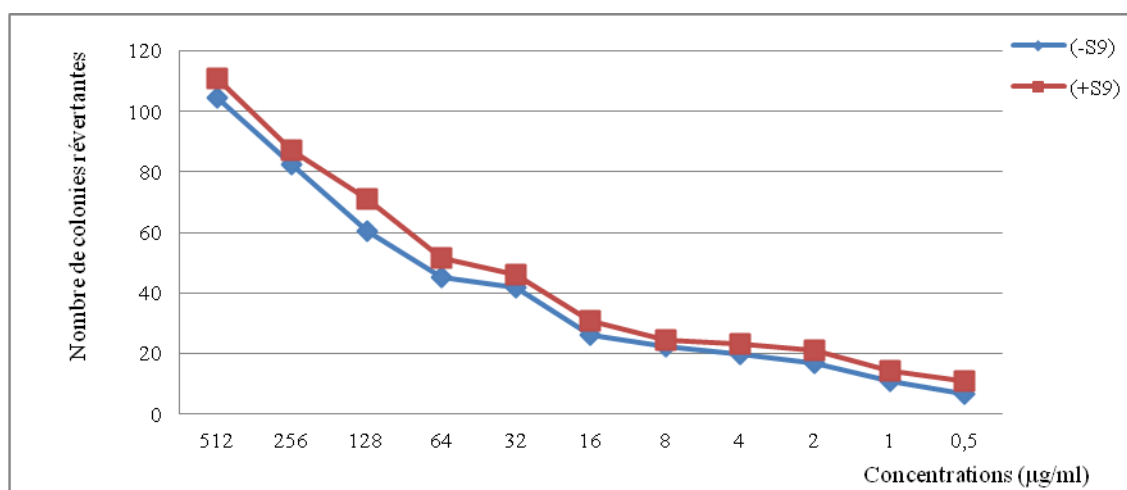
Concentrations ( $\mu\text{g/ml}$ )	TA 100		TA 98		TA 1535	
	(-S9)	(+S9)	(-S9)	(+S9)	(-S9)	(+S9)
512	$1873,66 \pm 21,52$	$4236,33 \pm 11,15$	$104,33 \pm 1,15$	$111 \pm 1$	$5781,66 \pm 23,15$	$8964 \pm 22$
256	$1429,66 \pm 11,52$	$3987 \pm 18$	$82,33 \pm 0,57$	$87 \pm 1$	$4962 \pm 17,73$	$8821 \pm 19,73$
128	$1297 \pm 17$	$3871 \pm 18,73$	$60,33 \pm 0,57$	$71 \pm 1,73$	$4741,33 \pm 20,3$	$8677,33 \pm 20,08$
64	$1238,33 \pm 18,52$	$3655,66 \pm 10,57$	$45 \pm 1$	$51,66 \pm 0,57$	$4337,66 \pm 14,52$	$8418,33 \pm 21,52$
32	$1221 \pm 21,73$	$3438 \pm 16$	$41,66 \pm 1,52$	$46 \pm 1$	$3652,33 \pm 12,51$	$7854 \pm 11,73$
16	$1187,33 \pm 15,15$	$2949,66 \pm 17,52$	$26 \pm 0$	$31 \pm 1$	$3432 \pm 20$	$7386 \pm 19$
8	$1125 \pm 12$	$2802 \pm 20$	$22,33 \pm 1,15$	$24,66 \pm 0,57$	$2372,66 \pm 20,51$	$5763 \pm 14,73$
4	$731,66 \pm 10,52$	$1876,66 \pm 11,52$	$19,66 \pm 0,57$	$23 \pm 1$	$1796 \pm 13$	$4019 \pm 12$
2	$689 \pm 8,54$	$1430,66 \pm 13,78$	$16,66 \pm 0,57$	$21 \pm 1$	$1537,66 \pm 10,52$	$3882 \pm 12$
1	$586,66 \pm 7,63$	$1106 \pm 5,29$	$11 \pm 0$	$14,33 \pm 0,57$	$1322,66 \pm 12,51$	$3190 \pm 20$
0,5	$586 \pm 5$	$936,66 \pm 10,96$	$6,66 \pm 0,57$	$11 \pm 0$	$1127 \pm 12,52$	$2342,33 \pm 10,52$

(-S9) : sans activation métabolique.

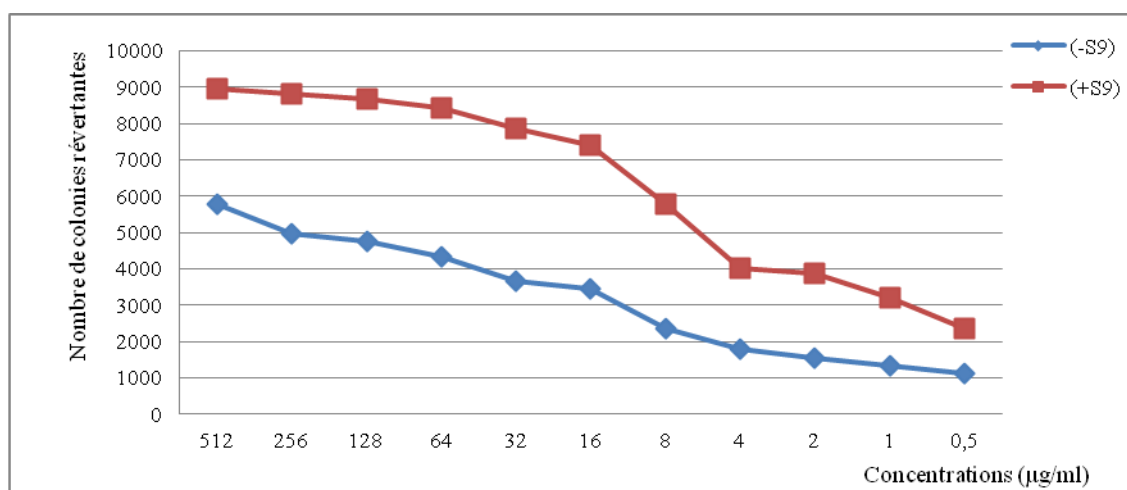
(+S9) : avec activation métabolique.



(a)



(b)



(c)

**Figure 35** : Nombre de colonies révertantes des souches **TA100** (a), **TA98** (b) et **TA1535** (c) en présence de la molécule **1d**, avec et sans activation métabolique (S9).

**5.1.3. Evaluation de l'effet génotoxique de la série de sulfamides 2a-f :**

**a. Evaluation de l'effet génotoxique de la molécule 2a :**

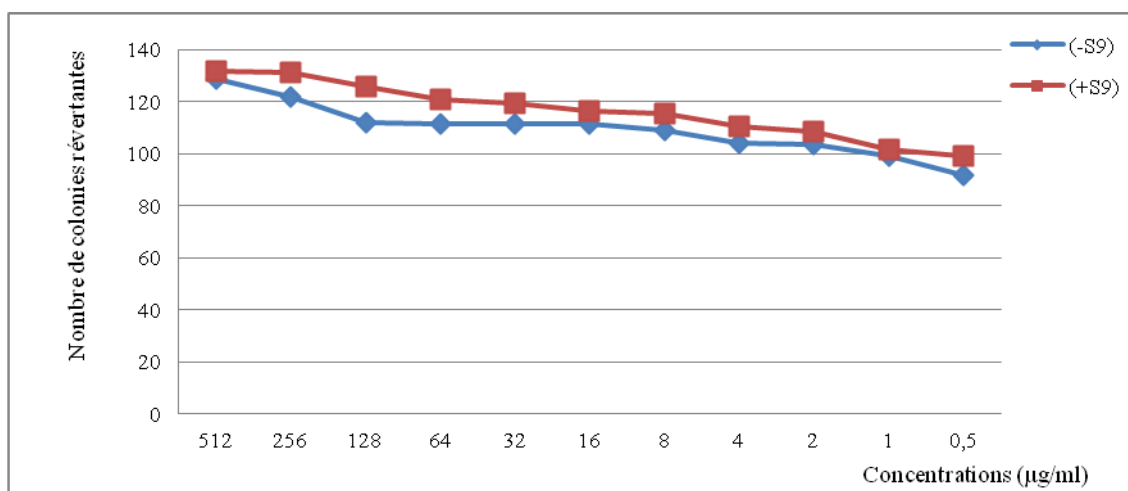
Les résultats obtenus montrent que la molécule **2a** [(N, N'- Bis (benzyl) sulfamide] ne présente aucun effet génotoxique vis-à-vis des trois souches de *S. typhimurium* TA100, TA98 et TA1535, avec et sans activation métabolique. Le nombre de colonies révertantes est faible avec toutes les souches et toutes les concentrations testées (Tableau 40), (Figure 36), (Photos 39, 40 et 41).

**Tableau 40 :** Dénombrement des colonies révertantes des souches de *S. typhimurium* **TA100**, **TA98** et **TA1535** vis-à-vis de la molécule **2a** avec et sans activation métabolique (S9).

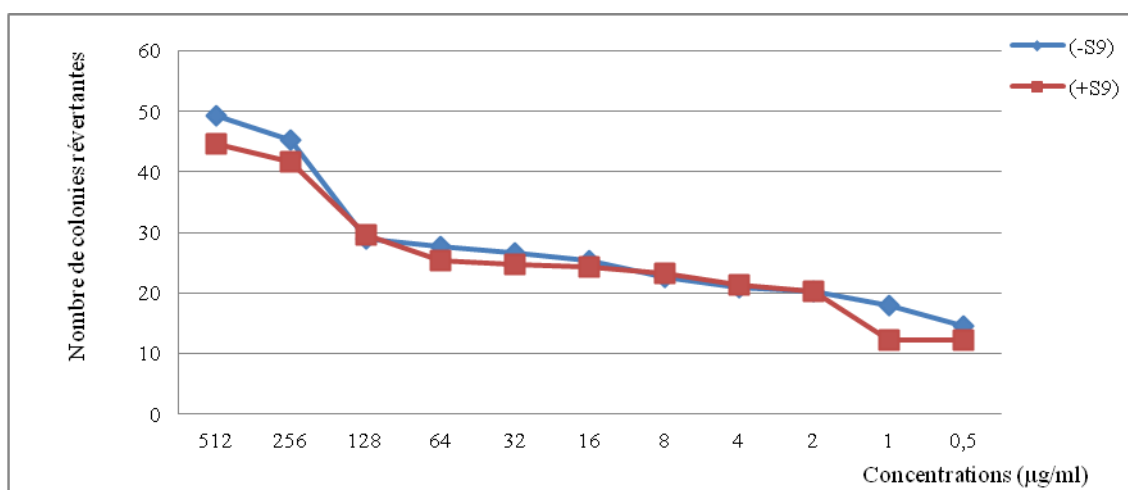
Concentrations (µg/ml)	TA 100		TA 98		TA 1535	
	(-S9)	(+S9)	(-S9)	(+S9)	(-S9)	(+S9)
<b>512</b>	128,66 ± 1,15	132 ± 3,6	49,33 ± 1,52	44,66 ± 4,72	24 ± 1	20 ± 0
<b>256</b>	122 ± 2	131,33 ± 5,03	45,33 ± 2,51	41,66 ± 1,52	20 ± 0	18,33 ± 0,57
<b>128</b>	112 ± 5,29	126 ± 2,64	29 ± 1	29,66 ± 1,52	17,66 ± 0,57	17 ± 1
<b>64</b>	111,66 ± 1,52	121 ± 2	27,66 ± 0,57	25,33 ± 1,15	16 ± 1	16,33 ± 0,57
<b>32</b>	111,33 ± 1,52	119,33 ± 2,08	26,66 ± 1,52	24,66 ± 0,57	15 ± 1	15,33 ± 0,57
<b>16</b>	111,33 ± 1,52	116,33 ± 2,51	25,33 ± 0,57	24,33 ± 1,52	12,66 ± 0,57	13,33 ± 0,57
<b>8</b>	109,09 ± 2,08	115,33 ± 0,57	22,66 ± 0,57	23,33 ± 1,52	12 ± 1	13 ± 1
<b>4</b>	104,33 ± 4,16	110,33 ± 0,57	21 ± 1	21,33 ± 1,52	11,33 ± 1,15	12 ± 1
<b>2</b>	103,66 ± 3,78	108,66 ± 1,52	20,33 ± 0,57	20,33 ± 1,52	11 ± 0	11,33 ± 1,15
<b>1</b>	99,33 ± 4,16	101,66 ± 2,08	18 ± 0	12,33 ± 1,52	10,33 ± 0,57	11,33 ± 2
<b>0,5</b>	92 ± 2,64	99 ± 2,64	14,66 ± 0,57	12,33 ± 1,15	6,66 ± 0,57	10,66 ± 1,15

(-S9) : sans activation métabolique.

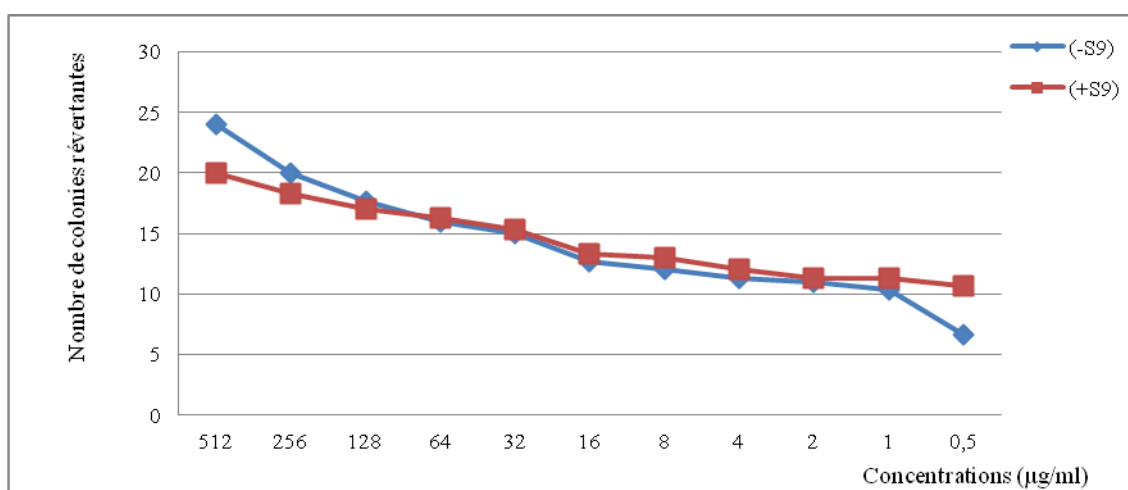
(+S9) : avec activation métabolique.



(a)

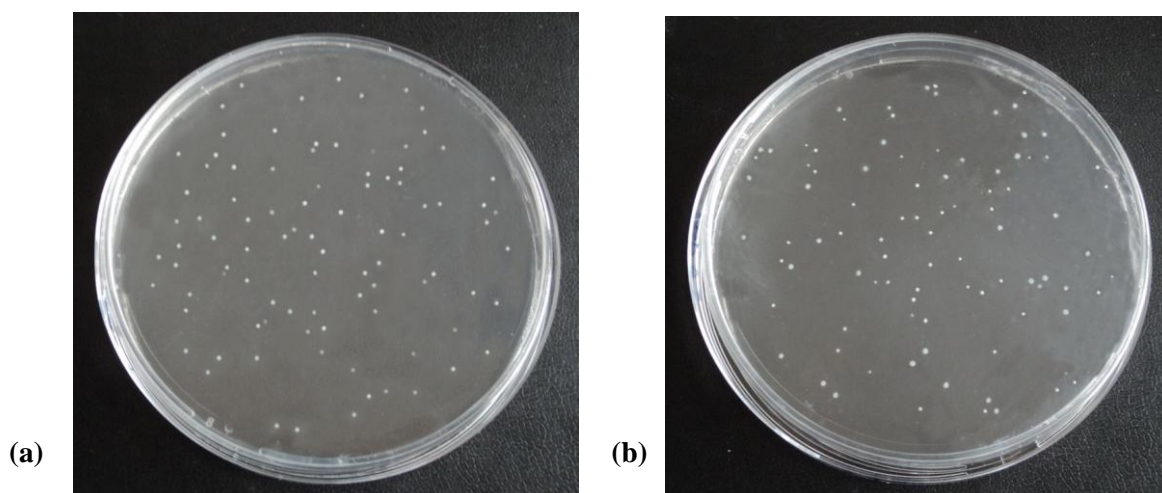


(b)

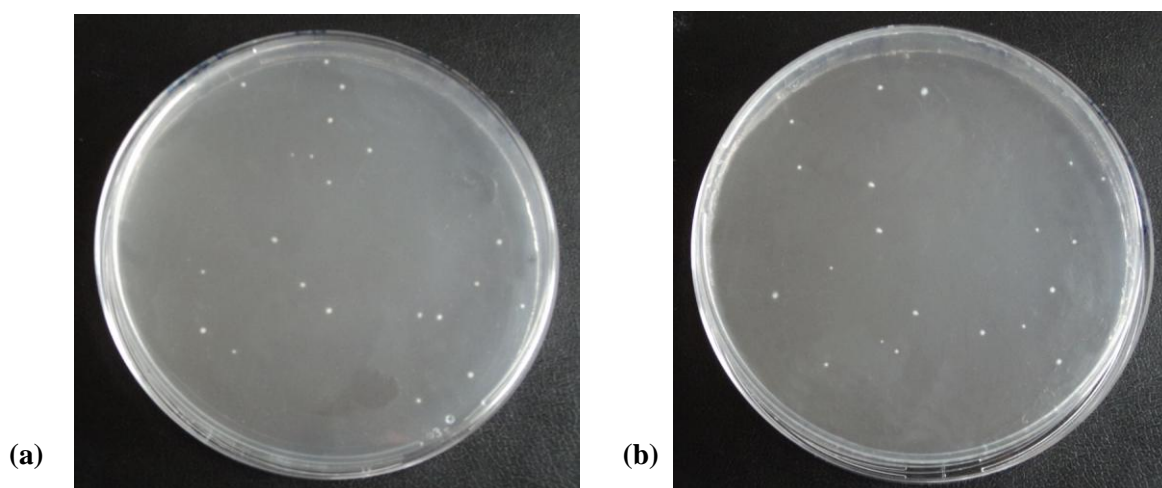


(c)

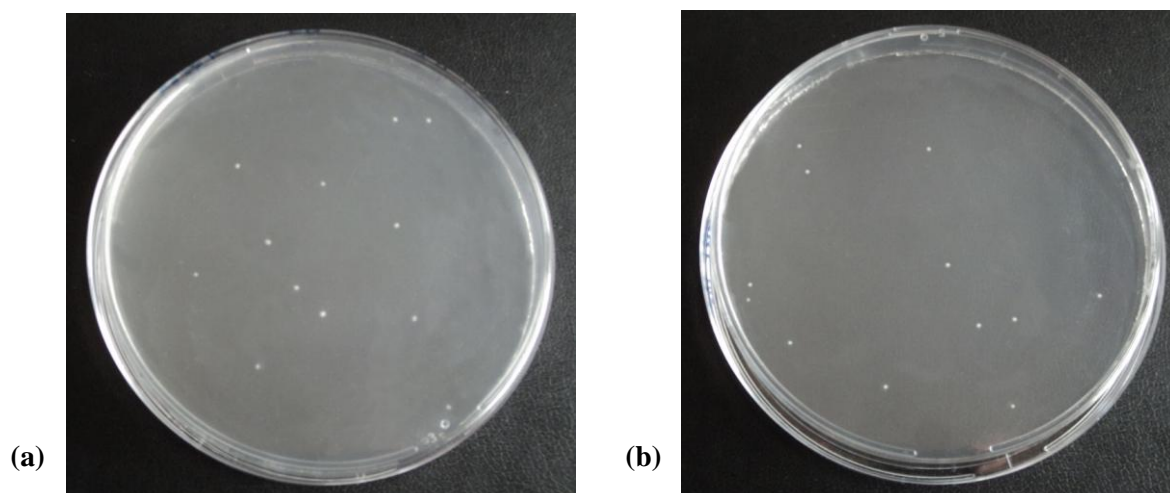
**Figure 36** : Nombre de colonies révertantes des souches TA100 (a), TA98 (b) et TA1535 (c) en présence de la molécule 2a, avec et sans activation métabolique (S9).



**Photo 39 :** Nombre de colonies révertantes de la souche **TA100** à concentration 1  $\mu\text{g/ml}$  de la molécule **2a**, sans (a) et avec activation métabolique (b).



**Photo 40 :** Nombre de colonies révertantes de la souche **TA98** à concentration 2  $\mu\text{g/ml}$  de la molécule **2a**, sans (a) et avec activation métabolique (b).



**Photo 41 :** Nombre de colonies révertantes de la souche **TA1535** à concentration 2  $\mu\text{g/ml}$  de la molécule **2a**, sans (a) et avec activation métabolique (b).

**b. Evaluation de l'effet génotoxique de la molécule 2b :**

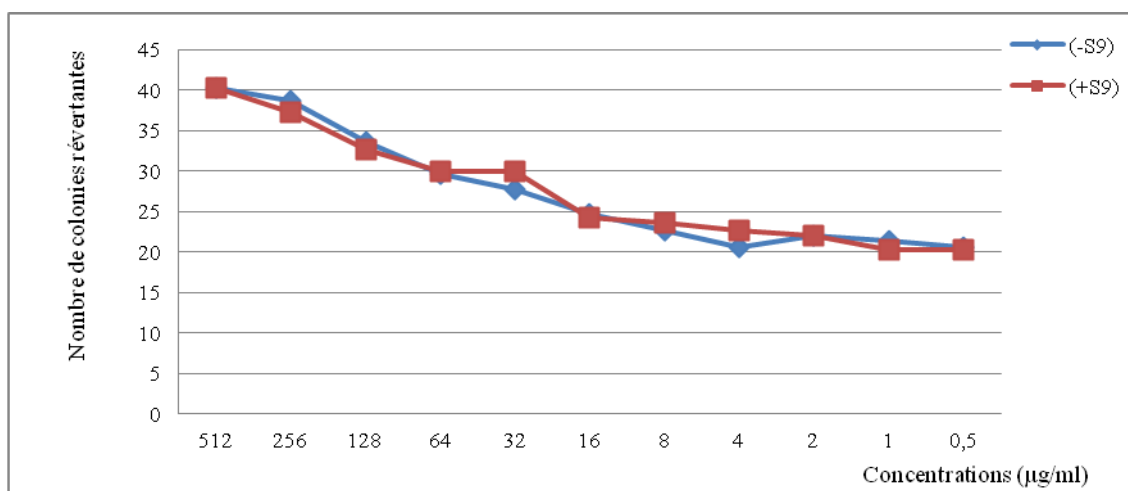
Les résultats obtenus montrent que, la molécule **2b** [(N, N'- Bis (phényléthyl) sulfamide)], ne présente aucun effet génotoxique vis-à-vis des trois souches de *S. typhimurium* TA100, TA98 et TA1535, avec et sans activation métabolique. Le nombre de colonies révertantes est faible avec toutes les souches et toutes les concentrations (Tableau 41), (Figure 37).

**Tableau 41 : Dénombrement des colonies révertantes des souches de *S. typhimurium* TA 100, TA98 et TA1535 vis-à-vis de la molécule 2b avec et sans activation métabolique (S9).**

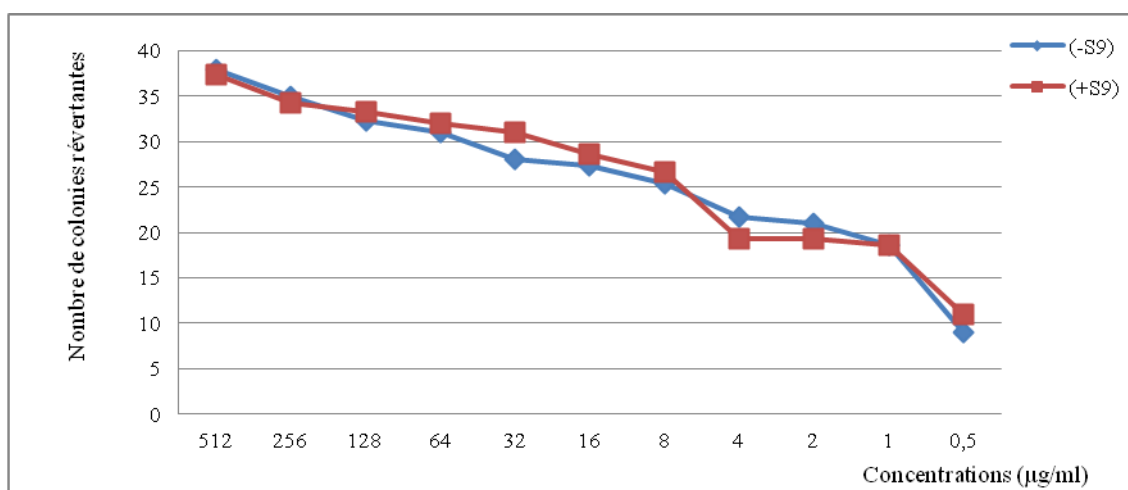
Concentrations (µg/ml)	TA 100		TA 98		TA 1535	
	(-S9)	(+S9)	(-S9)	(+S9)	(-S9)	(+S9)
512	40,33 ± 1,52	40,33 ± 1,52	38 ± 0	37,33 ± 1,15	33,33 ± 1,52	36,33 ± 1,52
256	38,66 ± 1,15	37,33 ± 0,57	35 ± 1	34,33 ± 3,21	30,33 ± 1,52	30,33 ± 0,57
128	33,66 ± 0,57	32,66 ± 1,52	32,33 ± 1,52	33,33 ± 0,57	29,66 ± 0,57	28,33 ± 1,52
64	29,66 ± 1,52	30 ± 2	31 ± 1	32 ± 2	29,66 ± 1,52	28 ± 1
32	27,77 ± 0,57	30 ± 0	28 ± 2	31 ± 1	28,75 ± 1,15	26,33 ± 1,15
16	24,66 ± 0,57	24,33 ± 1,52	27,33 ± 0,57	28,66 ± 1,15	28 ± 1	26 ± 2
8	22,66 ± 1,52	23,66 ± 1,52	25,33 ± 1,52	26,66 ± 1,52	27 ± 1	23,33 ± 1,52
4	20,66 ± 1,15	22,66 ± 1,15	21,66 ± 1,52	19,33 ± 1,52	24,66 ± 0,57	15,33 ± 0,57
2	22 ± 1	22 ± 1	21 ± 1	19,33 ± 0,57	14 ± 1	14 ± 1
1	21,33 ± 1,15	20,33 ± 0,57	18,66 ± 1,52	18,66 ± 1,52	12,33 ± 0,57	12 ± 0
0,5	20,66 ± 0,57	20,33 ± 2,51	9 ± 1	11 ± 2	10,66 ± 0,57	11,33 ± 0,57

(-S9) : sans activation métabolique.

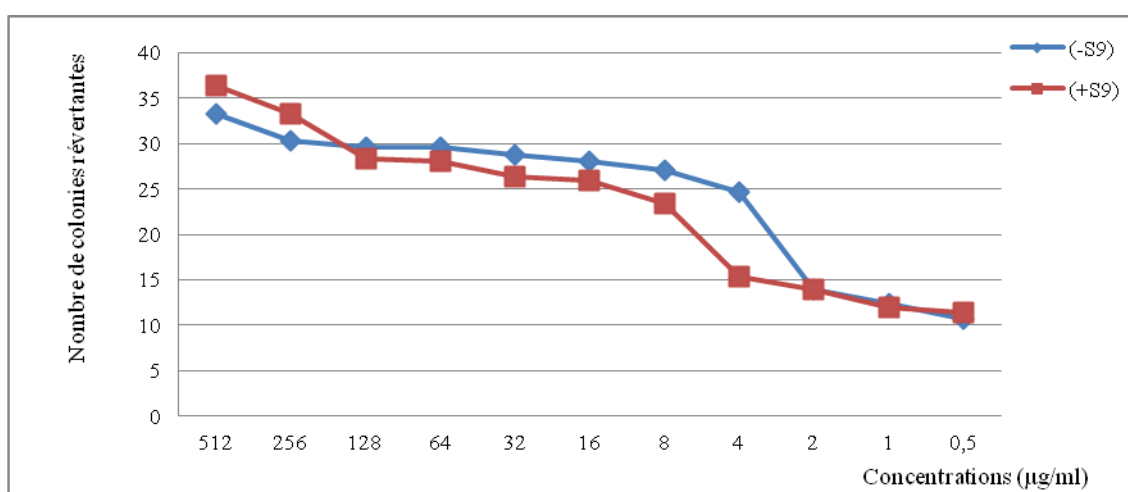
(+S9) : avec activation métabolique.



(a)



(b)



(c)

**Figure 37** : Nombre de colonies révertantes des souches **TA100** (a), **TA98** (b) et **TA1535** (c) en présence de la molécule **2b**, avec et sans activation métabolique (S9).

*c. Evaluation de l'effet génotoxique de la molécule 2c :*

Les résultats obtenus montrent que, la molécule **2c** [*N, N'*- Bis (propyl) sulfamide], ne présente

aucun effet génotoxique vis-à-vis des trois souches de *S. typhimurium* TA100, TA98 et TA153, avec et sans activation métabolique. Le nombre de colonies révertantes est faible avec toutes les souches et toutes les concentrations (Tableau 42), (Figure 38).

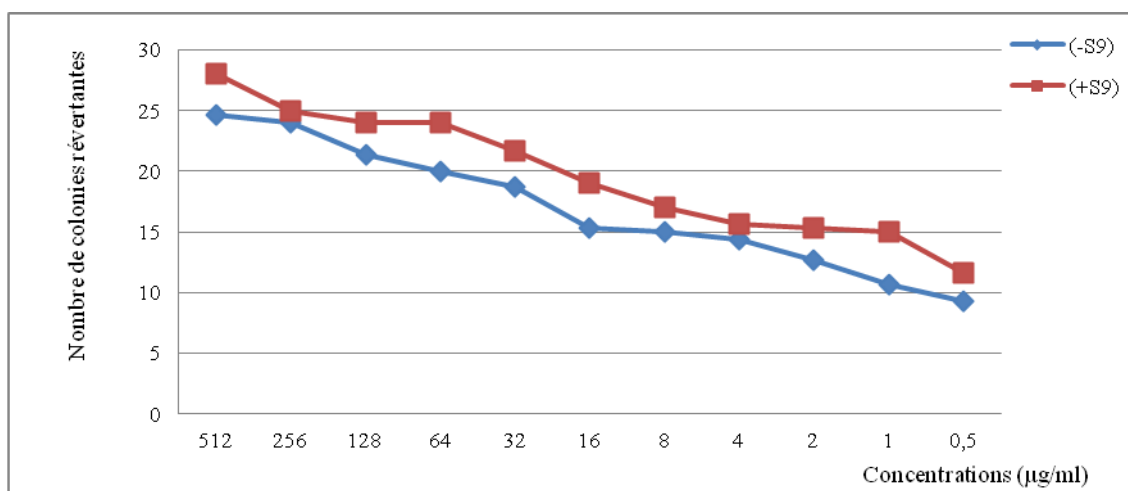
**Tableau 42 :** Dénombrement des colonies révertantes des souches de *S. typhimurium* **TA100**, **TA98** et **TA1535** vis-à-vis de la molécule **2c** avec et sans activation métabolique (S9).

Concentrations (µg/ml)	TA 100		TA 98		TA 1535	
	(-S9)	(+S9)	(-S9)	(+S9)	(-S9)	(+S9)
<b>512</b>	24,66 ± 0,57	28 ± 1	30 ± 2	32,33 ± 2,08	28,66 ± 1,15	32,66 ± 1,15
<b>256</b>	24 ± 0	25 ± 1	29 ± 1	32 ± 2	28,66 ± 1,15	30 ± 1
<b>128</b>	21,33 ± 1,52	24 ± 1	27 ± 1	27,33 ± 0,57	28,33 ± 1,52	29,33 ± 0,57
<b>64</b>	20 ± 1	24 ± 1	26 ± 1	25,66 ± 1,15	27,66 ± 0,57	28,66 ± 1,15
<b>32</b>	18,66 ± 1,52	21,66 ± 1,52	24,66 ± 1,52	25 ± 1	26,66 ± 1,52	27 ± 1
<b>16</b>	15,33 ± 1,52	19 ± 1	22,33 ± 1,52	21,33 ± 0,57	21,66 ± 1,52	25,33 ± 0,57
<b>8</b>	15 ± 1	17 ± 1	17,33 ± 0,57	17,33 ± 0,57	19,66 ± 2,08	23 ± 1
<b>4</b>	14,33 ± 0,57	15,66 ± 1,15	15,33 ± 0,57	15,33 ± 0,57	17 ± 2	22 ± 1
<b>2</b>	12,66 ± 1,15	15,33 ± 0,57	14,33 ± 1,52	14 ± 1	15,66 ± 0,57	16 ± 1
<b>1</b>	10,66 ± 0,57	15 ± 1	12,33 ± 0,57	13,66 ± 0,57	14,66 ± 0,57	14,33 ± 0,57
<b>0,5</b>	9,33 ± 1,15	11,66 ± 0,57	11 ± 1	11 ± 0	12,33 ± 2,08	11 ± 1

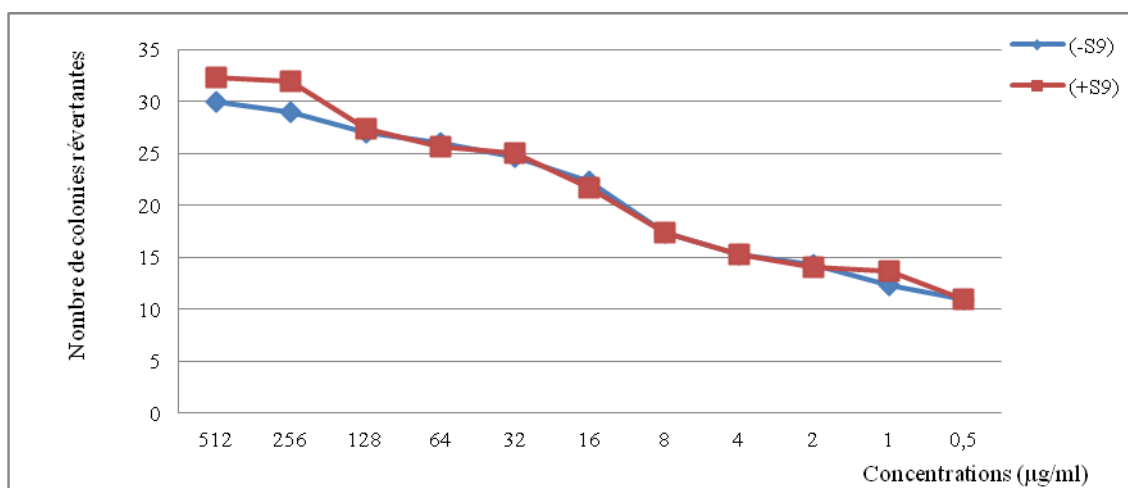
(-S9) : sans activation métabolique.

(+S9) : avec activation métabolique.

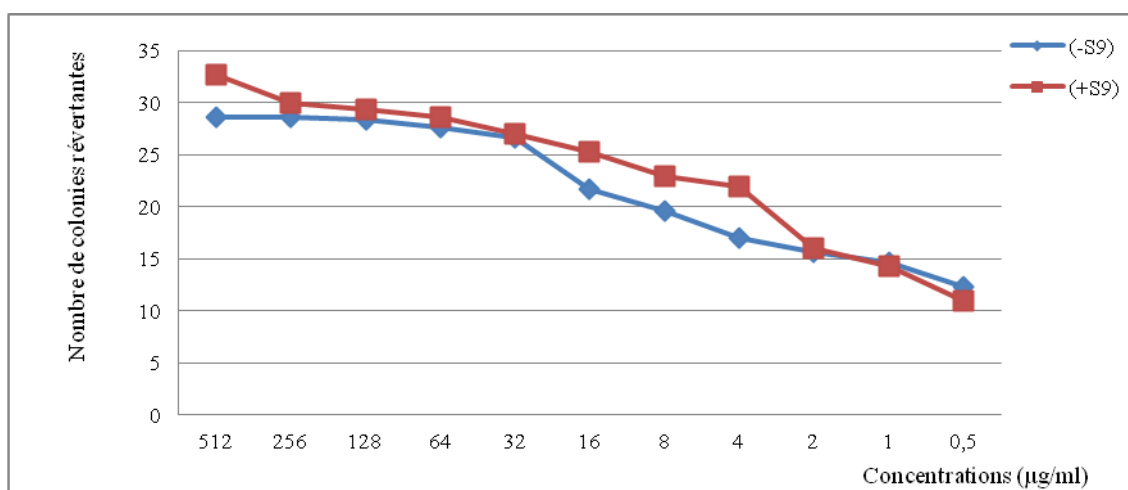




(a)



(b)



(c)

**Figure 38** : Nombre de colonies révertantes des souches TA100 (a), TA98 (b) et TA1535 (c) en présence de la molécule **2c**, avec et sans activation métabolique (S9).

**d. Evaluation de l'effet génotoxique de la molécule 2d :**

La molécule **2d** [*N, N'*-Dibenzyl-1,2,5-thiadiazolidine 1,1-dioxyde sulfamide], a montré un effet génotoxique avec la souche TA100 uniquement avec activation métabolique. Ce résultat montre clairement l'effet de la métabolisation par le S9 pour l'expression du pouvoir génotoxique de la molécule.

Le nombre de colonies révertantes avec activation métabolique varie entre  $530,66 \pm 11,15$  et  $880,66 \pm 13,05$  pour les concentrations 0,5 et 512  $\mu\text{g/ml}$  respectivement (Tableau 43) (Figure 39), (Photos 42, 43 et 44).

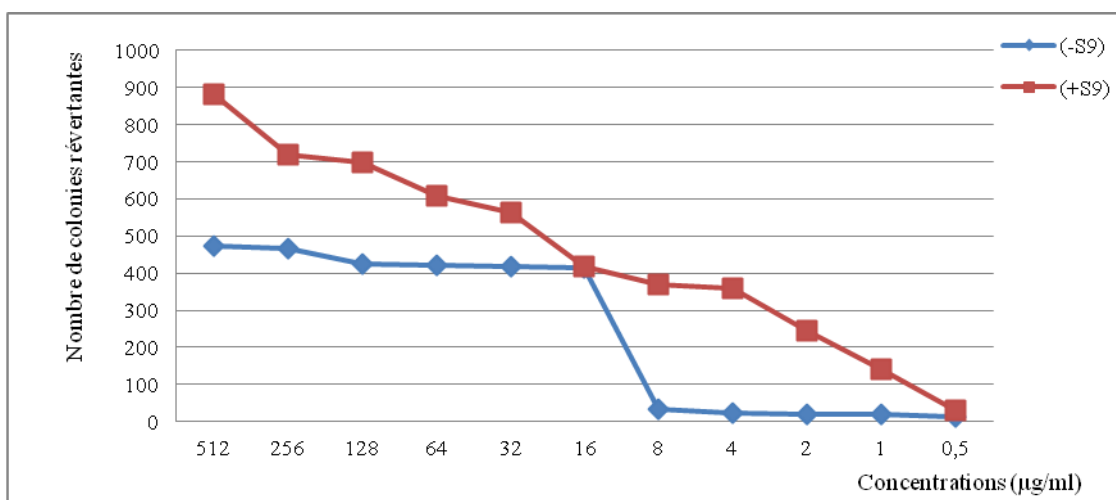
La molécule **2d** a exprimé un effet génotoxique en induisant une mutation de type substitution de paires de bases après activation métabolique (métabolisation).

**Tableau 43 :** Dénombrement des colonies révertants des souches de *S. typhimurium* **TA100**, **TA98** et **TA1535** vis-à-vis de la molécule **2d** avec et sans activation métabolique (S9).

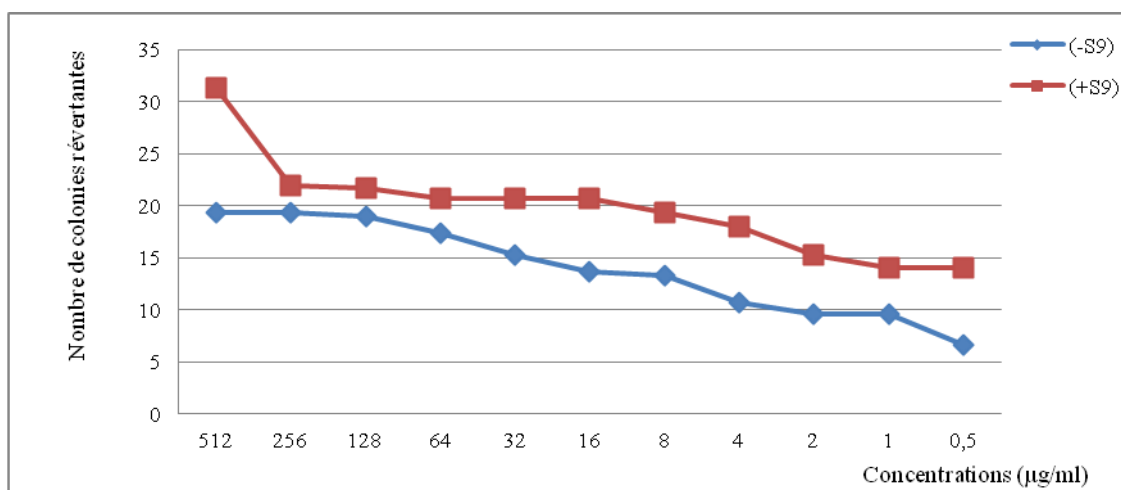
Concentrations ( $\mu\text{g/ml}$ )	TA 100		TA 98		TA 1535	
	(-S9)	(+S9)	(-S9)	(+S9)	(-S9)	(+S9)
<b>512</b>	$472 \pm 7,5$	$880,66 \pm 13,05$	$19,33 \pm 1,52$	$31,33 \pm 0,57$	$23 \pm 1$	$25 \pm 1$
<b>256</b>	$467 \pm 11$	$819 \pm 13,60$	$19,33 \pm 0,57$	$22 \pm 1$	$21,33 \pm 1,52$	$22 \pm 1$
<b>128</b>	$423,66 \pm 8,08$	$797,66 \pm 20,51$	$19 \pm 1$	$21,66 \pm 0,57$	$19 \pm 1$	$21 \pm 1$
<b>64</b>	$423 \pm 6,60$	$7607 \pm 12,64$	$17,33 \pm 0,57$	$20,66 \pm 2,08$	$19 \pm 1$	$20,33 \pm 0,57$
<b>32</b>	$419 \pm 2$	$6564,33 \pm 12,08$	$15,33 \pm 1,15$	$20,66 \pm 1,15$	$16,33 \pm 0,57$	$20 \pm 1,73$
<b>16</b>	$413,66 \pm 3,05$	$619,33 \pm 10,08$	$13,66 \pm 1,15$	$20,66 \pm 0,57$	$12,33 \pm 0,57$	$17,66 \pm 1,52$
<b>8</b>	$223,33 \pm 6,05$	$568,66 \pm 8,08$	$13,33 \pm 1,15$	$19,33 \pm 1,52$	$11 \pm 1$	$17 \pm 1$
<b>4</b>	$134 \pm 4$	$557,33 \pm 10,52$	$10,66 \pm 0,57$	$18 \pm 1$	$10,66 \pm 1,15$	$16 \pm 0$
<b>2</b>	$71,66 \pm 2,08$	$543,33 \pm 10,57$	$9,66 \pm 0,57$	$15,33 \pm 0,57$	$10,33 \pm 1,52$	$15,33 \pm 0,57$
<b>1</b>	$35,33 \pm 3,03$	$539,66 \pm 21,52$	$9,66 \pm 1,52$	$14 \pm 1$	$6,66 \pm 0,57$	$14 \pm 1$
<b>0,5</b>	$14 \pm 1$	$530,66 \pm 11,15$	$6,66 \pm 1,52$	$14 \pm 1$	$4,66 \pm 1,52$	$12,33 \pm 0,57$

(-S9) : sans activation métabolique.

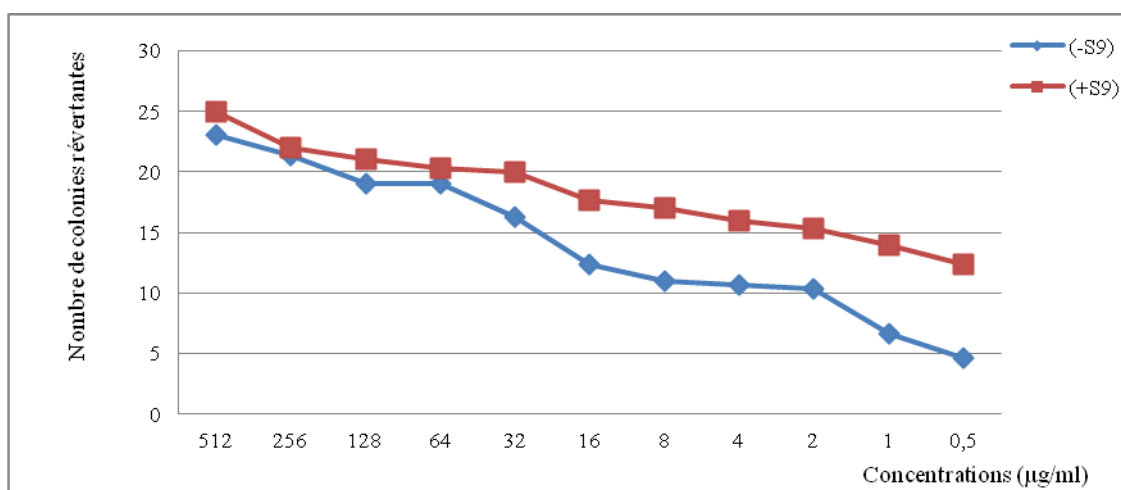
(+S9) : avec activation métabolique.



(a)

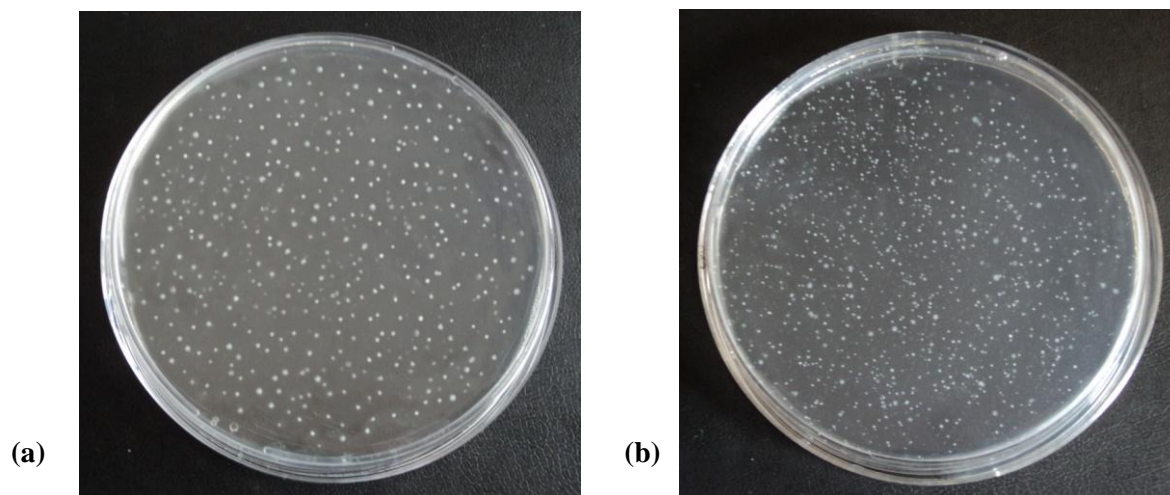


(b)

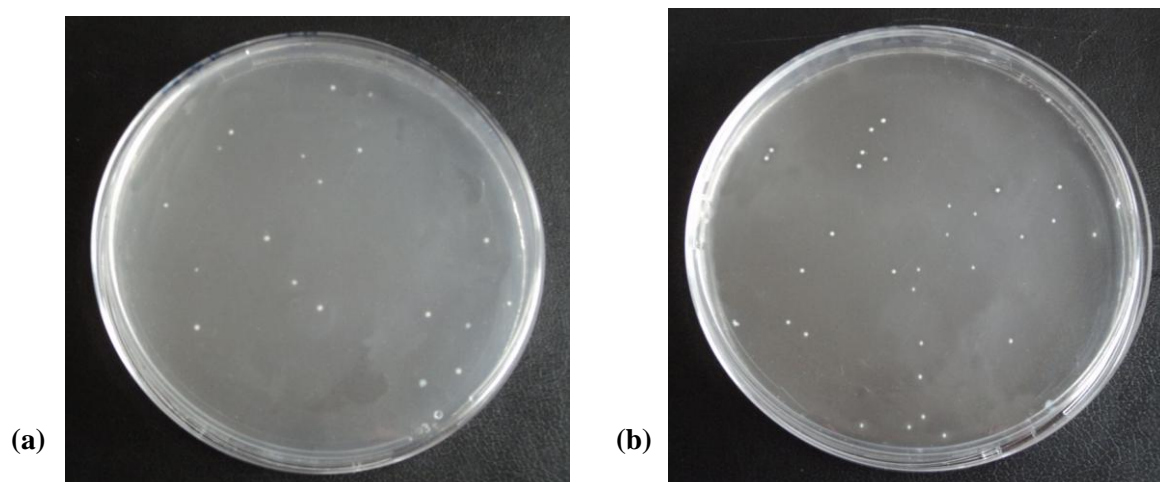


(c)

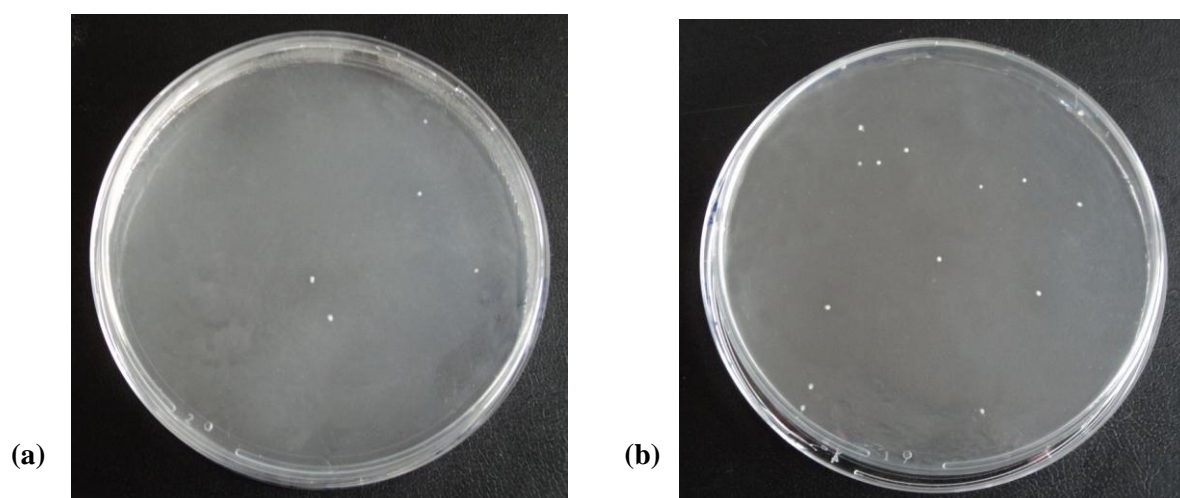
**Figure 39** : Nombre de colonies révertantes des souches TA100 (a), TA98 (b) et TA1535 (c) en présence de la molécule **2d**, avec et sans activation métabolique (S9).



**Photo 42 :** Nombre de colonies révertantes de la souche **TA100** à concentration 512 µg/ml de la molécule **2d**, sans (a) et avec activation métabolique (b).



**Photo 43 :** Nombre de colonies révertantes de la souche **TA98** à concentration 512 µg/ml de la molécule **2d**, sans (a) et avec activation métabolique (b).



**Photo 44 :** Nombre de colonies révertantes de la souche **TA1535** à concentration 0,5 µg/ml de la molécule **2d**, sans (a) et avec activation métabolique (b).

*e. Evaluation de l'effet génotoxique de la molécule 2e :*

La molécule **2e** [*N, N'*-bis (1-phenyléthyl)-1,2,5-thiadiazolidine 1,1-dioxyde sulfamide], a montré un effet génotoxique avec la souche TA100. Cette activité s'amplifie avec l'activation métabolique. Le nombre de colonies révertantes sans activation métabolique varie entre 4115 ± 23,46 et 4917,66 ± 25,5 avec les concentrations 0,5 et 512 µg/ml respectivement. Avec activation métabolique le nombre de colonies révertantes varie entre 5220,66 ± 13,51 (concentration 0,5 µg/ml) et 8893 ± 33 (concentration 512 µg/ml), (Tableau 44), (Figure 40).

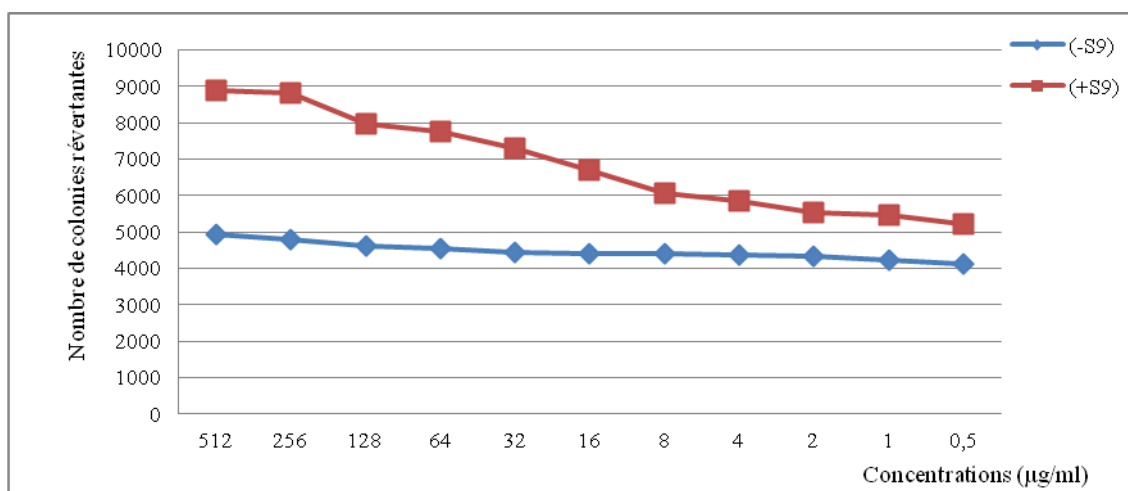
Cette molécule a exprimé un effet génotoxique en induisant une mutation de type substitution de paires de bases.

**Tableau 44 :** Dénombrement des colonies révertantes des souches de *S. typhimurium* **TA100**, **TA98** et **TA1535** vis-à-vis de la molécule **2e** avec et sans activation métabolique (S9).

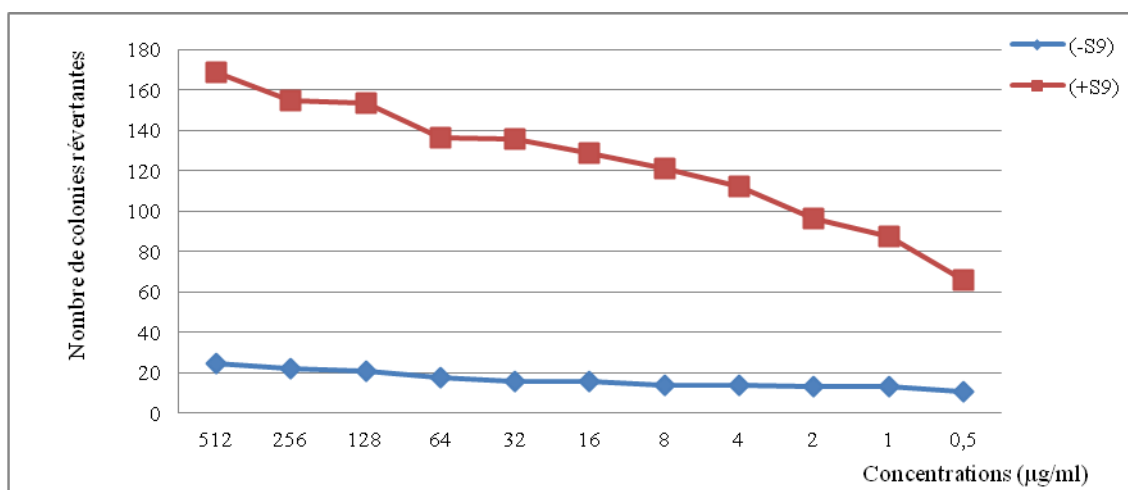
Concentrations (µg/ml)	TA 100		TA 98		TA 1535	
	(-S9)	(+S9)	(-S9)	(+S9)	(-S9)	(+S9)
<b>512</b>	4917,66 ± 25,5	8893 ± 33	24,66 ± 1,52	168,66 ± 1,15	28 ± 0	34,33 ± 0,57
<b>256</b>	4774 ± 32,6	8814,33 ± 25,03	22 ± 1	154,66 ± 2,08	26,33 ± 1,15	34 ± 2
<b>128</b>	4614,66 ± 24,72	7966 ± 26	21 ± 1	153,33 ± 1,15	25,66 ± 1,52	33 ± 1
<b>64</b>	4557,33 ± 14,5	7743,33 ± 14,5	17,33 ± 00,57	136,66 ± 1,15	25,33 ± 0,57	32,33 ± 0,57
<b>32</b>	4432,33 ± 18,04	7313 ± 28	16 ± 0	136 ± 2	23,33 ± 1,15	32 ± 1,73
<b>16</b>	4416,33 ± 21,51	6692,66 ± 24,5	15,66 ± 1,52	129 ± 1	23 ± 1	31,33 ± 1,15
<b>8</b>	4411,66 ± 24,5	6076,66 ± 20,04	13,66 ± 1,52	121 ± 1	21,66 ± 0,57	30,66 ± 0,57
<b>4</b>	4352,33 ± 22,51	5834,66 ± 31,05	13,66 ± 1,15	112 ± 2	21,33 ± 0,57	30 ± 0
<b>2</b>	4346,33 ± 24,5	5518,66 ± 24,5	13,33 ± 1,52	96,33 ± 2,08	21 ± 1	29,33 ± 1,52
<b>1</b>	4222,33 ± 26,04	5446 ± 25,56	13,33 ± 1,15	87,33 ± 0,57	19 ± 1	27,33 ± 1,52
<b>0,5</b>	4115 ± 23,46	5220,66 ± 13,51	10,66 ± 0,57	65,66 ± 0,57	17,66 ± 0,57	26,66 ± 1,52

(-S9) : sans activation métabolique.

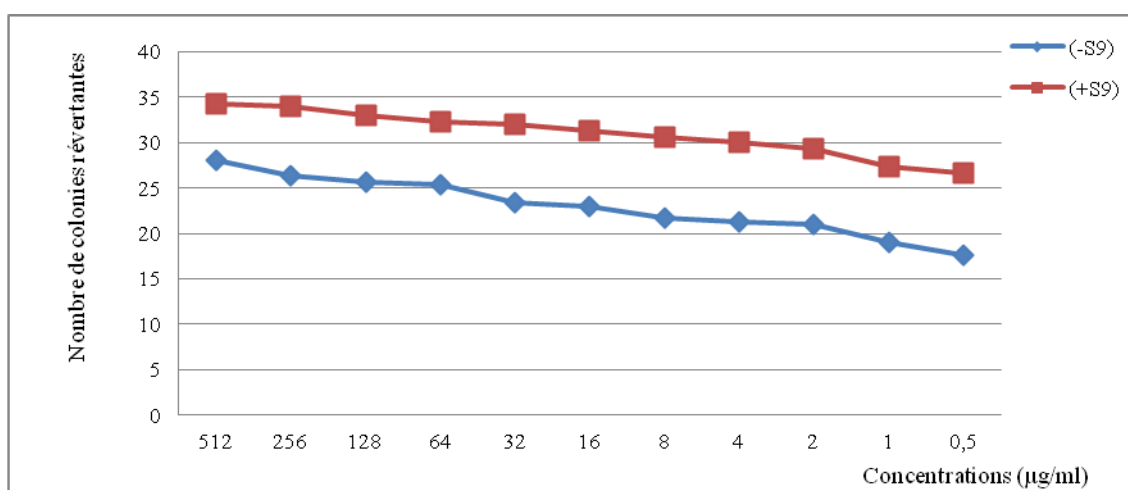
(+S9) : avec activation métabolique.



(a)



(b)



(c)

**Figure 40** : Nombre de colonies révertantes des souches TA100 (a), TA98 (b) et TA1535 (c) en présence de la molécule **2e**, avec et sans activation métabolique (S9).

**f. Evaluation de l'effet génotoxique de la molécule 2f :**

La molécule **2f** [*N,N'*-Dipropyl-1,2,5-thiadiazolidine 1,1-dioxyde sulfamide], a montré une activité génotoxique avec les souches TA100 (avec et sans activation métabolique), et TA1535 (avec activation métabolique). Aucun effet génotoxique n'a été observé avec la souche TA98 avec et sans activation métabolique.

Le nombre de colonies révertantes pour la souche TA100 sans activation métabolique varie entre  $1468,33 \pm 17,5$  et  $3419,66 \pm 13,52$  avec les concentrations 0,5 et 512  $\mu\text{g/ml}$  respectivement. Avec activation métabolique le nombre de colonies révertantes augmente et varie entre  $1952,33 \pm 26,38$  et  $6872,66 \pm 11,15$  pour les concentrations respectives 0,5 et 512  $\mu\text{g/ml}$ .

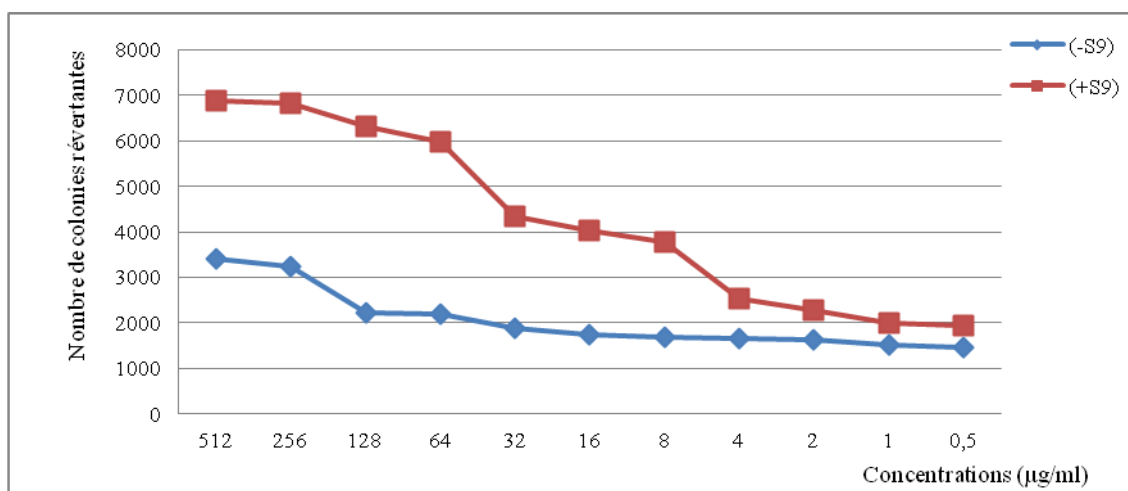
Concernant la souche TA1535, le nombre de colonies révertantes avec activation métabolique varie entre  $975,33 \pm 12$  et  $1829,66 \pm 21,51$  pour les concentrations respectives 0,5 et 512  $\mu\text{g/ml}$  (Tableau 45), (figure 41).

Cette molécule a exprimé un effet génotoxique en induisant une mutation de type substitution de paires de bases.

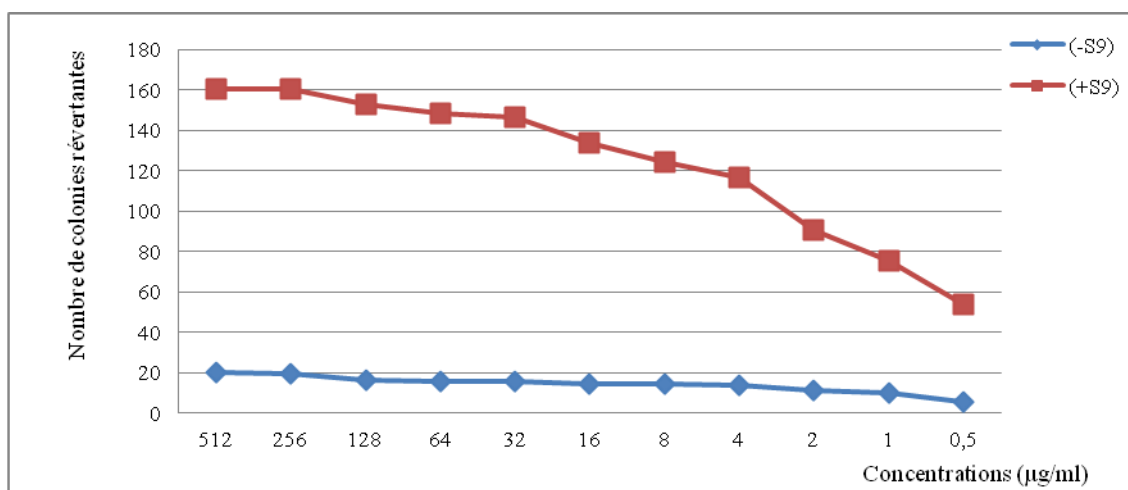
**Tableau 45 :** Dénombrement des colonies révertantes des souches de *S. typhimurium* **TA100**, **TA98** et **TA1535** vis-à-vis de la molécule **2f** avec et sans activation métabolique (S9).

Concentrations ( $\mu\text{g/ml}$ )	TA 100		TA 98		TA 1535	
	(-S9)	(+S9)	(-S9)	(+S9)	(-S9)	(+S9)
<b>512</b>	$3419,66 \pm 13,52$	$6872,66 \pm 11,15$	$20,33 \pm 1,52$	$21 \pm 1$	$467,33 \pm 13,51$	$1829,66 \pm 21,51$
<b>256</b>	$3233 \pm 23,51$	$6835 \pm 21,07$	$19,66 \pm 1,52$	$20,66 \pm 1,15$	$391 \pm 12$	$1757,33 \pm 11,52$
<b>128</b>	$2232 \pm 20,78$	$6323,66 \pm 15,17$	$16,66 \pm 1,15$	$19,66 \pm 0,57$	$331,66 \pm 21,08$	$1647,33 \pm 12,51$
<b>64</b>	$2199,33 \pm 11,67$	$5988,33 \pm 5,56$	$16 \pm 1$	$18,33 \pm 0,57$	$316 \pm 14,64$	$1597,33 \pm 14,08$
<b>32</b>	$1893,66 \pm 7,02$	$4352,33 \pm 11,23$	$15,66 \pm 1,15$	$18 \pm 1$	$314,66 \pm 12,51$	$1511,33 \pm 14,04$
<b>16</b>	$1730,66 \pm 21,82$	$4018 \pm 18$	$14,66 \pm 0,57$	$16,66 \pm 0,57$	$285 \pm 11,73$	$1364,66 \pm 10,16$
<b>8</b>	$1696 \pm 9,64$	$3773,33 \pm 10,59$	$14,33 \pm 1,15$	$15,33 \pm 0,57$	$283,33 \pm 11,52$	$1215,66 \pm 13,05$
<b>4</b>	$1650 \pm 10$	$2544,33 \pm 11,01$	$13,66 \pm 0,57$	$15 \pm 0$	$233,33 \pm 8,51$	$1155,66 \pm 11,21$
<b>2</b>	$1632 \pm 12$	$2291 \pm 6,8$	$11 \pm 1$	$12,66 \pm 1,15$	$212 \pm 13,6$	$1160 \pm 19,01$
<b>1</b>	$1510,33 \pm 10,01$	$1983,33 \pm 15,27$	$10 \pm 0$	$8,33 \pm 1,52$	$94,33 \pm 6,51$	$987 \pm 12$
<b>0,5</b>	$1468,33 \pm 17,5$	$1952,33 \pm 26,38$	$5,66 \pm 0,57$	$4,33 \pm 0,57$	$33 \pm 1$	$975,33 \pm 3,05$

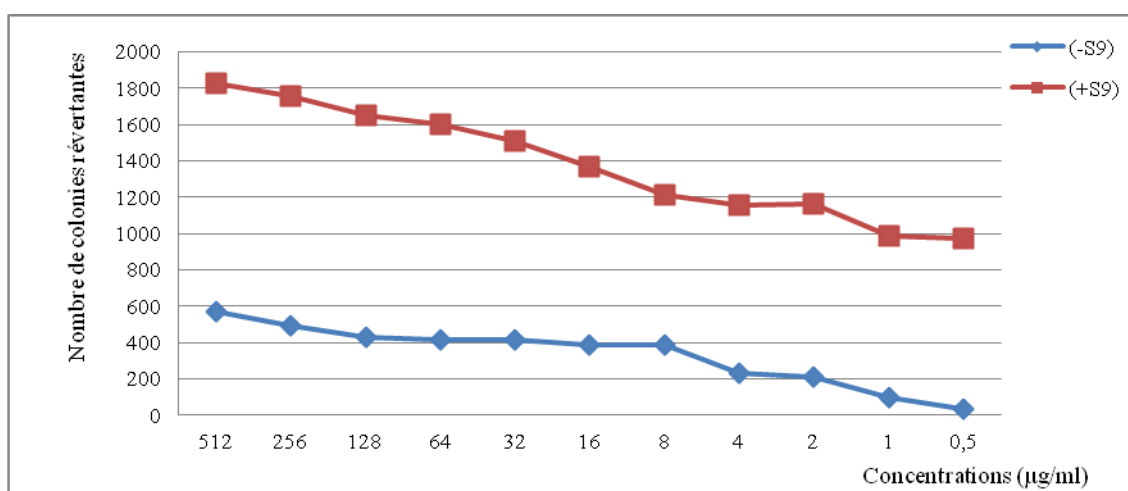
(-S9) : sans activation métabolique.  
 (+S9) : avec activation métabolique.



(a)



(b)



(c)

**Figure 41** : Nombre de colonies révertantes des souches TA100 (a), TA98 (b) et TA1535 (c) en présence de la molécule **2f**, avec et sans activation métabolique (S9).



**5.1.4. Evaluation de l'effet génotoxique des deux témoins (Bactrim et sulfaguanidine) :**

**a. Evaluation de l'effet génotoxique du Bactrim (témoin 1) :**

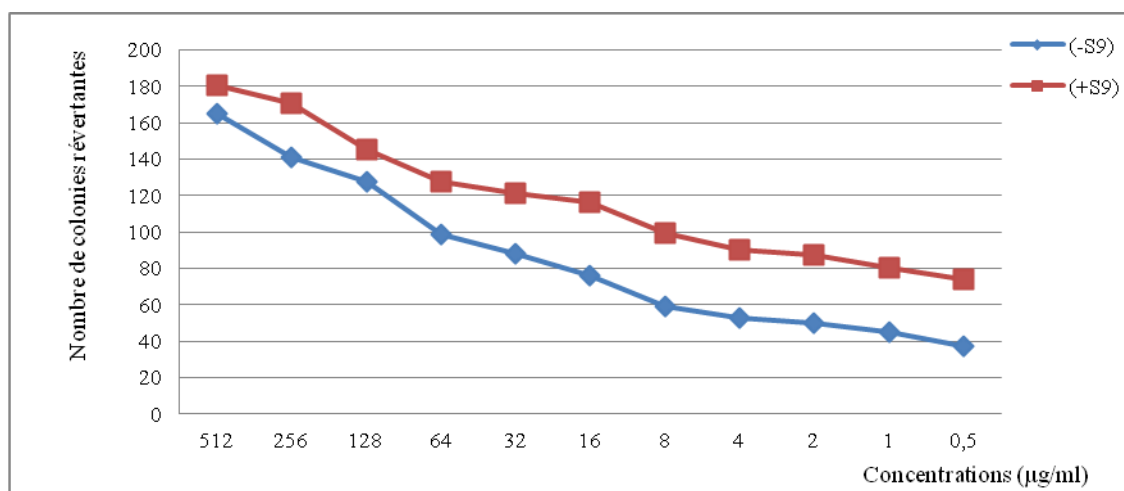
Les résultats obtenus pour le Bactrim (témoin 1), ne montrent aucun effet génotoxique vis-à-vis des trois souches de *S. typhimurium* TA100, TA98 et TA153, avec et sans activation métabolique. Le nombre de colonies révertantes est faible avec toutes les souches et toutes les concentrations (Tableau 46), (figure 42).

**Tableau 46 : Dénombrement des colonies révertantes des souches de *S. typhimurium* TA 100, TA98 et TA1535 vis-à-vis de la molécule témoin 1 (Bactrim) avec et sans activation métabolique (S9).**

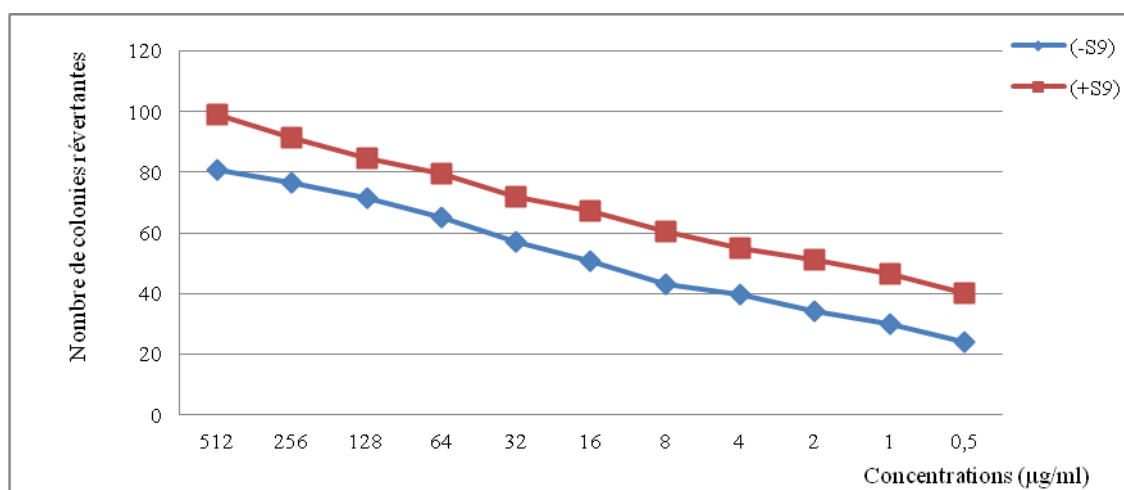
Concentrations (µg/ml)	TA 100		TA 98		TA 1535	
	(-S9)	(+S9)	(-S9)	(+S9)	(-S9)	(+S9)
512	165,33 ± 1,15	180,66 ± 1,15	80,66 ± 1,15	99 ± 1	49,33 ± 0,57	60 ± 0
256	141 ± 1	170,33 ± 1,15	76,66 ± 1,15	91,33 ± 1,15	40,66 ± 1,15	55,66 ± 0,57
128	127,66 ± 0,57	145,33 ± 1,15	71,33 ± 1,15	84,66 ± 0,57	36 ± 1	50,66 ± 1,15
64	98,66 ± 1,52	127,66 ± 1,52	65 ± 1	79,66 ± 0,57	33 ± 0	49 ± 1
32	88 ± 0	121 ± 0	57 ± 1	72 ± 0	30,33 ± 0,57	42,33 ± 1,15
16	76,33 ± 0,57	116 ± 1	50,66 ± 0,57	67,33 ± 0,57	27,33 ± 0,57	38 ± 0
8	59,33 ± 0,57	99 ± 1	43 ± 0	60,66 ± 0,57	23,66 ± 0,57	34 ± 1
4	53 ± 3	90,33 ± 0,57	39,66 ± 0,57	55 ± 0	20,33 ± 0,57	29,66 ± 0,57
2	49,66 ± 1,52	87 ± 1	34,33 ± 0,57	51 ± 4	16 ± 0	28 ± 0
1	45,33 ± 0,57	80,33 ± 0,57	30 ± 1	46,33 ± 1,52	15 ± 0	25 ± 1
0,5	37,33 ± 1,15	74 ± 1	24 ± 0	40 ± 2	12,66 ± 1,15	22 ± 1

(-S9) : sans activation métabolique.

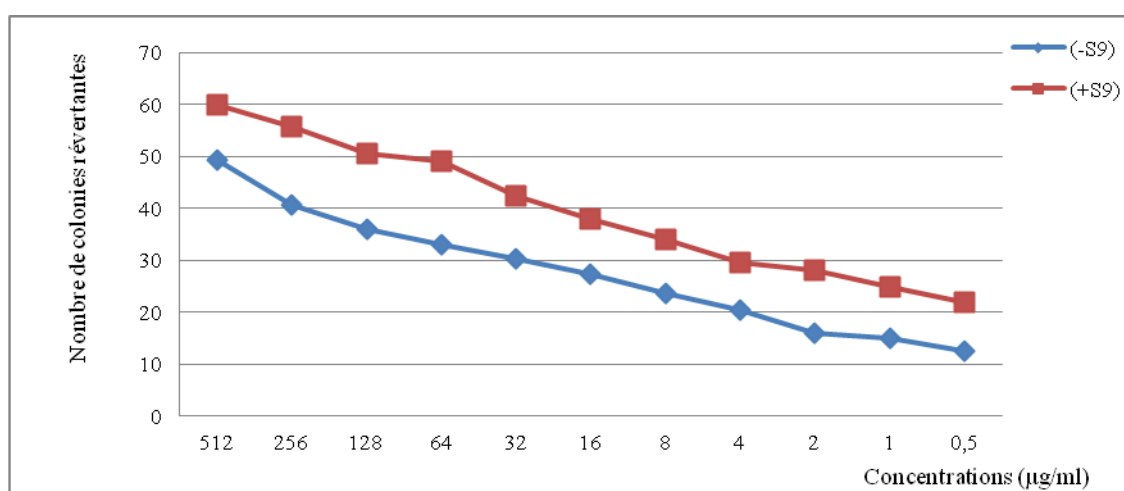
(+S9) : avec activation métabolique.



(a)



(b)



(c)

**Figure 42** : Nombre de colonies révertantes des souches TA100 (a), TA98 (b) et TA1535 (c) du Bactrim (T1), avec et sans activation métabolique (S9).

**b. Evaluation de l'effet génotoxique du Sulfaguanidine (témoin 2) :**

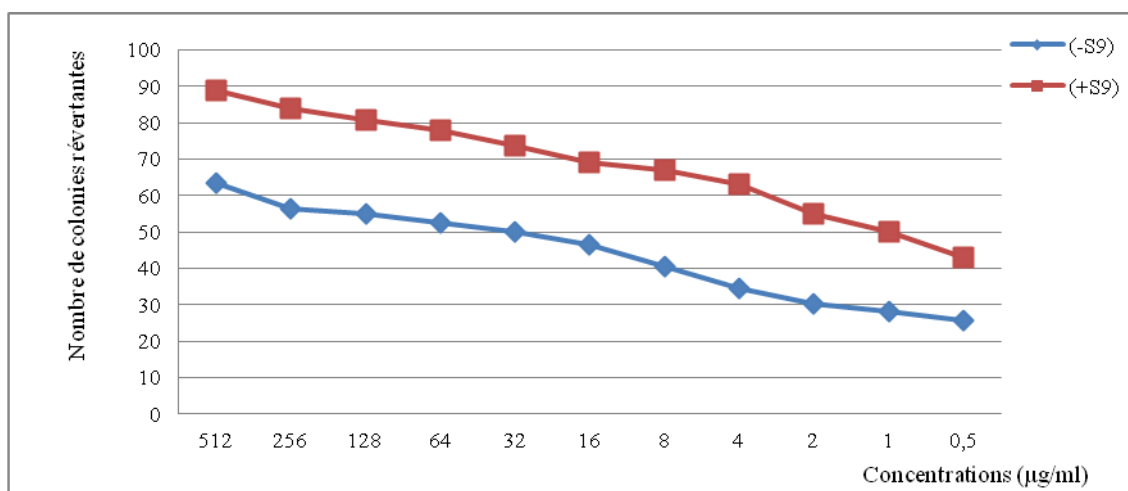
Le Sulfaguanidine (témoin 2), n'a montré aucun effet génotoxique avec les trois souches de *S. typhimurium* TA100, TA98 et TA1535, avec et sans activation métabolique. Le nombre de colonies révertantes est faible pour les trois souches, et ce avec la totalité des concentrations (Tableau 47), (Figure 43).

**Tableau 47 : Dénombrement des colonies révertantes des souches de *S. typhimurium* TA100, TA98 et TA1535 vis-à-vis de la molécule témoin 2 (Sulfaguanidine) avec et sans activation métabolique (S9).**

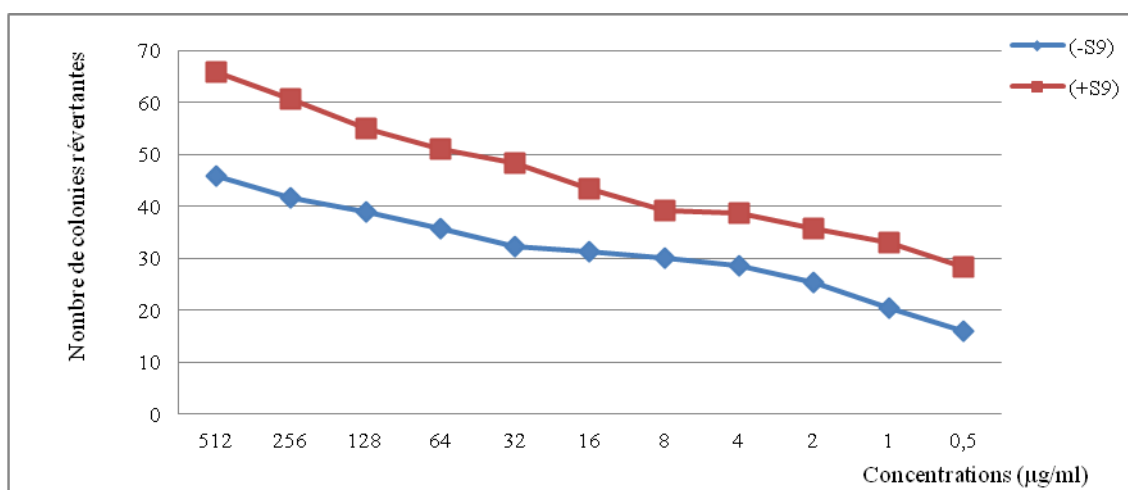
Concentrations (µg/ml)	TA 100		TA 98		TA 1535	
	(-S9)	(+S9)	(-S9)	(+S9)	(-S9)	(+S9)
512	63,33 ± 1,15	89 ± 1	46 ± 0	66 ± 1,73	54 ± 1	67 ± 1
256	56,33 ± 0,57	84 ± 1	41,66 ± 0,57	60,66 ± 1,15	50,66 ± 0,57	62,66 ± 0,57
128	55 ± 2	80,66 ± 1,15	39 ± 1	55 ± 0	46,66 ± 0,57	60 ± 5
64	52,33 ± 0,57	78 ± 1	35,66 ± 0,57	51 ± 1	41 ± 0	56,66 ± 1,15
32	50 ± 3	73,66 ± 1,52	32,33 ± 0,57	48,33 ± 0,57	35 ± 1	51,66 ± 1,15
16	46,66 ± 0,57	69 ± 1	31,33 ± 0,57	43,33 ± 1,15	30 ± 0	47,33 ± 0,57
8	40,66 ± 1,15	67 ± 1	30 ± 0	39,33 ± 1,15	28,66 ± 0,57	43,33 ± 1,15
4	34,66 ± 0,57	63 ± 1	28,66 ± 0,57	38,66 ± 1,15	26,33 ± 0,57	40 ± 2
2	30,33 ± 0,57	55 ± 1	25,33 ± 0,57	35,66 ± 0,57	25,66 ± 0,57	37,33 ± 0,57
1	28 ± 0	50 ± 0	20,33 ± 0,57	33 ± 0	25 ± 0	31,66 ± 1,52
0,5	25,66 ± 0,57	43 ± 2	16 ± 0	28,33 ± 1,52	21,33 ± 0,57	29 ± 1

(-S9) : sans activation métabolique.

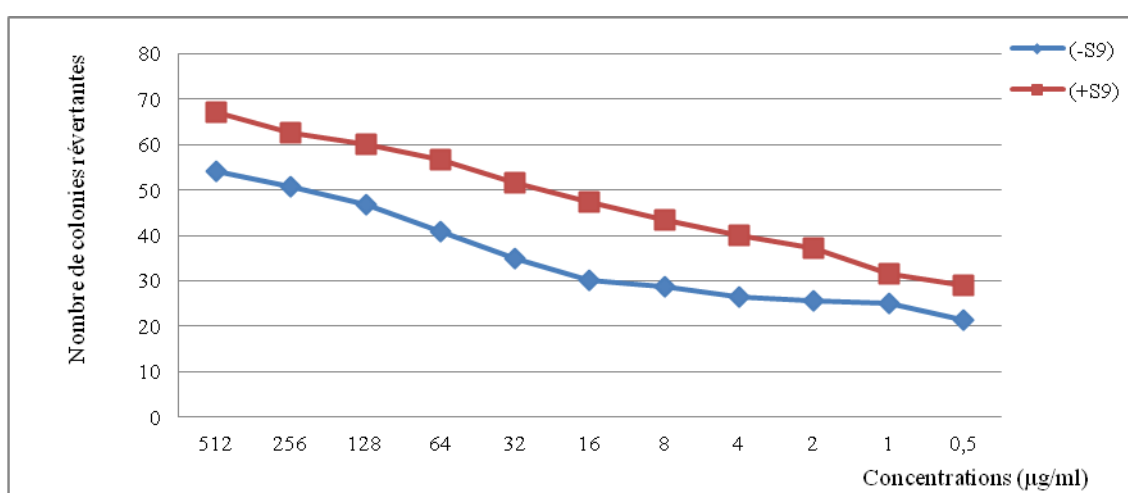
(+S9) : avec activation métabolique.



(a)



(b)



(c)

**Figure 43** : Nombre de colonies révertantes des souches **TA100** (a), **TA98** (b) et **TA1535** (c) du Sulfaguanidine (**T2**), avec et sans activation métabolique (S9).

## 5.2. Les SOS Chromotest :

Les résultats obtenus avec le SOS Chromotest sont en accord avec ceux obtenus avec le test d'Ames. Nous remarquons que pour les quatre molécules de sulfamides de la première série **1a-d**, une génotoxicité dose-dépendante est mise en évidence, avec les molécules **1a**, **1b** et **1d**, par l'apparition de la couleur verte due à l'expression de la  $\beta$ -galactosidase qui est liée à l'induction du système SOS. Les valeurs exponentielles des  $DO_{605}$  sont comparables à celles du témoin positif 4-NQO, qui exprime également une couleur bleue due à l'expression de la  $\beta$ -galactosidase. L'intensité de la couleur dans les puits de la microplaque est en rapport avec l'intensité de la réponse génotoxique (bleue/ verte) (Photo 42).

La molécule **1c**, n'est pas génotoxique. Les résultats obtenus avec les différentes concentrations sont comparables au témoin négatif révélant une couleur jaune dans les puits de la microplaque, et des  $DO_{405}$  identiques. La couleur jaune révèle la viabilité de la souche *E. coli* PQ37 et est due à l'expression de la phosphatase alcaline mesurée à  $DO_{405}$  (Photo 45).

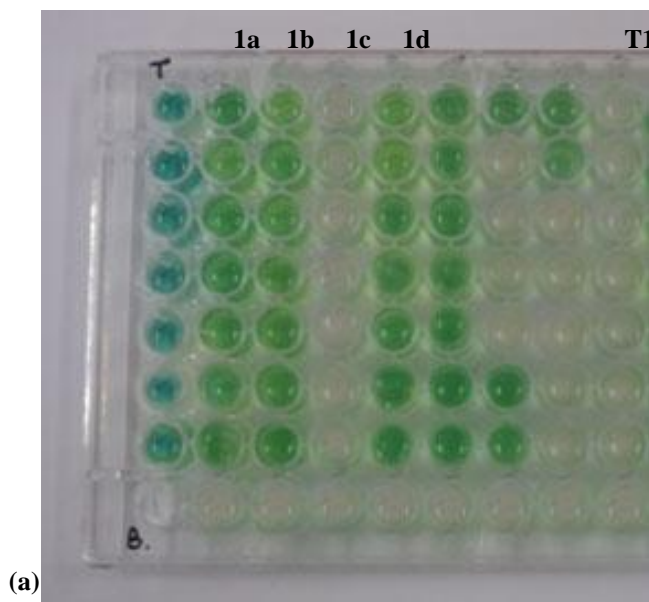
Concernant les molécules **2a-c** de structures linéaires, le SOS Chromotest a révélé le caractère non génotoxique de ces molécules. Ceci est révélé par l'apparition de la couleur jaune dans les puits de la microplaque, comparables à celle des puits témoins qui exprime la croissance bactérienne avec l'expression de la phosphatase alcaline ; les  $DO_{405}$  sont presque identiques. (Photo 46).

Pour les molécules **2d-f** de structures cycliques, le SOS Chromotest a montré un effet génotoxique. En effet, comparativement aux puits du témoin positif 4-NQO la couleur verte témoigne de l'expression de la  $\beta$ -galactosidase liée à l'induction du système de réparation SOS donnant une courbe dose-dépendante avec des  $DO_{605}$  qui augmentent en fonction de l'augmentation de la concentration.

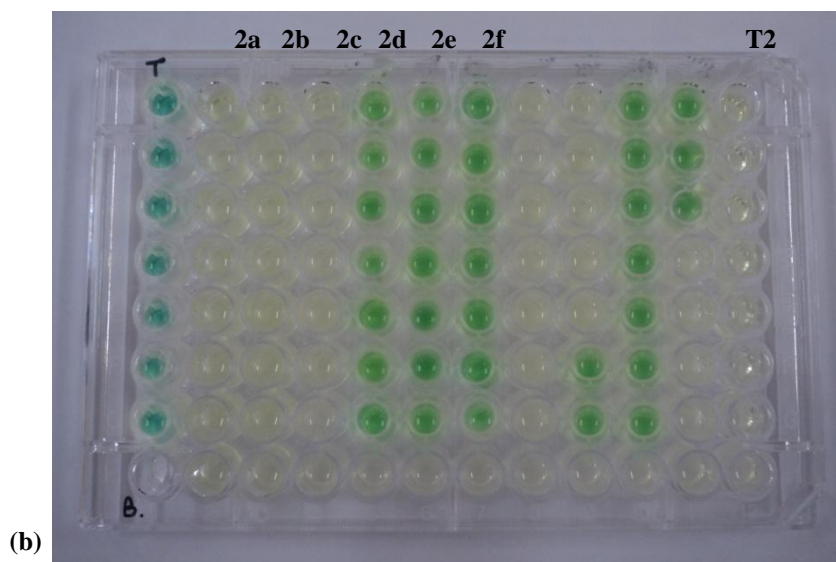
Le SOSIP est calculé pour les molécules **1a**, **1b**, **1d**, **2d**, **2e** et **2f** qui ont donné une réponse génotoxique colorimétrique positive (couleur verte) ainsi que des  $DO_{605}$  dose-dépendantes. Pour les trois molécules **1a**, **1b**, **1d**, le SOSIP est de 20,51 ; 14,76 et 20,51 respectivement. Pour les trois molécules cycliques **2d-f**, le SOSIP est de 24,35 ; 26,92 et 21,35 respectivement.

Le témoin positif 4-NQO a donné un SOSIP égal à 71,97, et est identique à celui décrit dans la littérature (Tableau 48).

Si le SOSIP est inférieur ou égal à 0, cela signifie que la molécule est non génotoxique. Concernant les deux molécules témoins utilisées dans notre travail, aucun effet génotoxique n'a été signalé avec le SOS chromotest.



**Photo 45 :** Résultats du SOS Chromotest de la série de sulfamides **1a-d**.



**Photo 46:** Résultats du SOS Chromotest de la série de sulfamides **2a-f**.

**Tableau 48 :** Résultats du SOSIP des sulfamides **1a-d** et **2a-f** ainsi que des deux molécules témoins (Bactrim et Sulfaguanidine).

Molécules	SOSIP	SOSIP corrigé (/0,39)	Génotoxicité
<b>4-NQO</b>	28	71,97	(+)
<b>1a</b>	8	20,51	(+)
<b>1b</b>	5,76	14,76	(+)
<b>1c</b>	0	0	(-)
<b>1d</b>	8	20,51	(+)
<b>2a</b>	0	0	(-)
<b>2b</b>	0	0	(-)
<b>2c</b>	0	0	(-)
<b>2d</b>	9,5	24,35	(+)
<b>2e</b>	10,5	26,92	(+)
<b>2f</b>	8,33	21,35	(+)
<b>Témoin 1</b>	0	0	(-)
<b>Témoin 2</b>	0	0	(-)

(+) : Génotoxicité positive/ Présence d'effet génotoxique.

(-) : Génotoxicité négative/ absence d'effet génotoxique.

#### **Conclusion 4 :**

L'évaluation de l'effet génotoxique a permis de mettre en évidence la présence d'une génotoxicité parmi les molécules testées.

Les molécules **1a**, **1b** et **1d** présentent un effet génotoxique, que ce soit avec ou sans activation métabolique. Ces molécules portent le phenyl combiné à un autre motif à savoir le methoxy, le fluore et l'éthyl.

La molécule **1c** qui porte un radical phenyl seul, ne présente aucun effet génotoxique, avec ou sans activation métabolique.

En ce qui concerne la deuxième série de molécules de sulfamides **2a-f**, les 3 molécules linéaires **2a-c** [*N, N'*- Bis (benzyl) sulfamide, (*N, N'*- Bis (phenyléthyl) sulfamide et le *N, N'*- Bis (propyl) sulfamide] n'ont montré aucun effet génotoxique, contrairement aux 3 molécules cycliques **2d-f** [*N, N'*-Dibenzyl-1,2,5-thiadiazolidine 1,1-dioxyde sulfamide, *N, N'*-bis (1-phenyléthyl)-1,2,5-thiadiazolidine 1,1-dioxyde sulfamide et le *N,N'*-Dipropyl-1,2,5-thiadiazolidine 1,1-dioxyde sulfamide] qui se sont avérées génotoxiques (mutagènes) avec les souches du test d'Ames avec et sans activation métabolique.

Toutes les molécules génotoxiques ont exprimé une génotoxicité sur les souches TA100 et TA1535, traduisant ainsi des mutations de type substitution de paires de bases.

Les deux médicaments témoins ne montrent aucun effet génotoxique avec les trois souches de *S. typhimurium* (test d'Ames) avec et sans activation métabolique (S9).

Les résultats obtenus avec le SOS Chromotest ont confirmé les résultats obtenus avec le test d'Ames. Les molécules ont exprimé leur potentiel génotoxique en stimulant la production de la  $\beta$ -galactosidase d'où la couleur verte. Les molécules non génotoxiques ont juste exprimé la couleur jaune de la phosphatase alcaline qui exprime une croissance bactérienne sans effet génotoxique.





## ***DISCUSSION***

Les antibiotiques ont été la plus grande avancée thérapeutique du XX<sup>e</sup> siècle. Ils ont permis de sauver d'innombrables vies menacées par des infections autrefois fatales. Malheureusement, le III<sup>e</sup> millénaire s'ouvre sur une crainte majeure : la résistance des bactéries aux antibiotiques.

Les résistances bactériennes ont débuté dès les premières années d'utilisation de la pénicilline G. A partir de 1970 elles ont posé de vraies difficultés pour le traitement des infections hospitalières (entérobactéries et autres bacilles à Gram négatif d'abord, et plus tard les germes à Gram positif). A la fin des années 80, de nouvelles menaces de résistance apparaissent chez les pathogènes communautaires (**Trémolières et al., 2005 ; Saga et Yamaguchi, 2009**).

Les bactéries résistantes aux médicaments, en particulier les entérobactéries, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pneumoniae* ... tuent plus de deux millions de personnes chaque année et mettent en sérieux danger la santé humaine (**Yeh et al., 2009**).

Cette résistance est un problème complexe, croissant et significatif, surtout avec la diminution, voir la raréfaction de l'arsenal d'antibiotiques déjà existant et le manque de nouveaux antibiotiques réduisant notablement les possibilités thérapeutiques pour lutter efficacement contre les principaux problèmes d'augmentation et de dissémination rapide des résistances bactériennes aux antibiotiques. C'est probablement l'un des problèmes de santé publique les plus inquiétants de ces dernières années. La multirésistance, due essentiellement au mauvais usage des antimicrobiens, joue un rôle important en infectiologie communautaire et nosocomiale (**Grare et al., 2010**).

Le nombre de nouveaux antibiotiques a précipitamment baissé au cours des 25 dernières années. Une diminution de près de 75% a été observée pour les antibiotiques systémiques, approuvés par la FDA (Food and Drug Administration) entre 1983 et 2007 ; cette baisse est particulièrement importante entre 2003 et 2007 (**Grare et al., 2010**).

Cette évolution rapide de la résistance bactérienne aux antibiotiques les plus commercialisés encourage la découverte de nouvelles molécules. Par conséquent, le développement de nouveaux agents antimicrobiens continue d'attirer l'attention et constitue un domaine de recherche rigoureux. Bien qu'un grand nombre d'antibiotiques et d'agents chimiothérapeutiques soient disponibles pour usage médical, la résistance antimicrobienne entraîne un besoin croissant de nouveaux agents antimicrobiens (**Coates et al., 2002 ; Borrell et al., 1998**).

Le travail que nous avons effectué au cours de cette thèse aborde les points suivants : la résistance bactérienne aux antibiotiques standards des souches cliniques isolées, l'évaluation de

l'activité antibactérienne des molécules de sulfamides innovantes, l'évaluation de la cytotoxicité de ces nouvelles molécules ainsi que l'évaluation de leur effet génotoxique.

### ❖ **Résistance bactérienne des souches cliniques aux antibiotiques standards :**

Depuis une vingtaine d'années, on assiste à une augmentation importante et régulière de la résistance aux antibiotiques utilisés dans le traitement des infections communautaires et hospitalières, où on observe une augmentation rapide de la prévalence de bactéries multirésistantes, aussi bien chez les bactéries à Gram négatif que chez les bactéries à Gram positif. En effet certaines pathologies anciennes réapparaissent parfois sous des aspects cliniques inhabituels (**Veyssier, 1995 ; Taubes, 2008**).

L'évolution rapide de la résistance bactérienne aux antibiotiques est un phénomène actuellement préoccupant dans les pays en voie de développement où les pathogènes résistants aux antibiotiques peuvent avoir une plus forte prévalence dans certains pays africains (**Bradford, 2001**). En Algérie, les données récentes de résistance aux antibiotiques sont inquiétantes. En effet, ces dix dernières années ont été marquées par l'émergence et la dissémination de nouveaux gènes de résistance notamment dans le nord du pays. Les défis majeurs de cette résistance ont été rencontrés principalement chez différentes espèces d'entérobactéries (**Rice, 2001 ; Baba Ahmed-Kazi Tani et Arlet, 2014**).

Au cours des dernières décennies, une attention particulière dans le domaine des agents pathogènes multirésistants a été accordée aux staphylocoques dorés et particulièrement aux staphylocoques dorés résistants à la méticilline (SARM) ainsi qu'aux entérocoques résistants à la vancomycine qui sont particulièrement préoccupants. **Antri et al., (2010)**, a démontré que *S. aureus* est l'un des principaux agents étiologiques des infections suppuratives superficielles et profondes ainsi que des syndromes liés à l'action des toxines. Actuellement, le traitement des infections affiche un plus grand défi pour le clinicien (**Kamath et al., 2010 ; de Kraker et al., 2011**).

Dans notre étude nous avons isolé 40 souches de *S. aureus*, parmi lesquelles 28 souches de SARM. La majorité des souches (55%) a été isolée à partir de pus ; ce résultat est similaire à celui obtenu par **Elhamzaoui et al., (2009)**, dans lequel 62,70% des souches de *S. aureus* ont

été isolées de pus. Le reste des souches a été isolé à partir d'urine (22,5 %), de PDP (7,5 %) et de sang (15%).

Les pourcentages de résistance aux antibiotiques, obtenus dans notre travail, sont de 78,33% pour les  $\beta$ -lactamines, de 100% pour les aminosides, de 62,5% et de 80% pour la tétracycline. En plus de la sensibilité à la gentamicine, nos souches présentent également une sensibilité moyenne vis-à-vis des macrolides ; elle est de 65% pour le triméthoprim/sulfaméthoxazole.

Nos résultats s'accordent avec ceux de **Djahmi et al., (2013)**, obtenus dans une étude effectuée sur 85 isolats de *S. aureus* et qui ont montré un haut niveau de résistance à tous les traitements anti-staphylococciques classiques tels que les  $\beta$ -lactamines, les aminosides, les quinolones et la tétracycline ; 85,9% des souches étaient des SARM. Ces souches ont été sensibles aux glycopeptides et à la gentamicine.

Concernant les SARM, nous rapportons dans notre étude un taux de 70%. **Alioua et al., (2014)** ont rapporté un taux de 80% dans le cas des infections acquises dans l'unité des soins intensifs au niveau du CHU Annaba. Une étude réalisée par **Antri et al., (2010)** au CHU Mustapha-Bacha d'Alger sur des souches de *S. aureus* montre que les SARM ont des fréquences de 35 % en communautaire et de 49 % à l'hôpital.

Les souches isolées dans ces deux dernières études présentaient des résistances à la majorité des antibiotiques, ce qui est le cas également pour nos souches.

*Enterococcus faecalis* a été initialement considéré comme une des bactéries commensales du tractus gastro-intestinal, qui sont parfois associées à des infections de l'appareil urinaire (**Amyes, 2007**). En effet, la totalité de nos souches étaient isolées à partir d'urines.

*E. faecalis* est, également, considéré comme étant un germe très répandue, associé à un nombre croissant d'infections. L'acquisition de résistance à la vancomycine par ces souches est particulièrement préoccupante aboutissant souvent à des échecs thérapeutiques (**Amyes, 2007**).

L'émergence des entérocoques comme agents responsables d'infections nosocomiales date d'une vingtaine d'années. Elle est, volontiers, attribuée à l'existence chez ces bactéries de multiples résistances naturelles aux antibiotiques dont les sulfamides, les céphalosporines, les aminosides, la clindamycine, les fluoroquinolones et à l'activité médiocre des macrolides et de l'association triméthoprim/sulfaméthoxazole. A ces résistances naturelles s'ajoutent des résistances acquises aux trois principales classes d'antibiotiques utilisés dans le traitement des infections à entérocoque telle que les pénicillines (**Rice, 2001**).

Nos souches ont montré une grande résistance à la majorité des antibiotiques standards utilisés allant jusqu'à 100% pour l'oxacilline, la céphalosporine, les aminosides, l'ofloxacine et les sulfamides. Elles restent sensibles à la pénicilline, l'amoxicilline, amoxicilline/acide clavulanique, l'imipénème, la ciprofloxacine et la vancomycine. Une souche isolée parmi les six était résistante à la vancomycine.

Nos résultats s'accordent à ceux obtenus par **Rice, (2001)** et **Amyes, (2007)** concernant la résistance de ces souches à plusieurs antibiotiques. Ces auteurs ont montré que les souches d'*E. faecalis* ont tendance à être sensibles à l'ampicilline, même si elles expriment une résistance à la vancomycine. Néanmoins, ces souches restent 100% sensibles à la pénicilline, l'amoxicilline et l'amoxicilline/acide clavulanique, et 83,34% sensibles à l'imipénème et à la vancomycine.

Récemment, les bactéries à Gram négatif, notamment productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE), ont gagné une importance croissante. Les entérobactéries sont parmi les souches les plus fréquemment isolées chez les patients hospitalisés. Elles sont souvent responsables d'infections urinaires, pulmonaires, de septicémies mais également d'autres infections intra-abdominales (**Paterson, 2006 ; de Kraker et al., 2011**). *E. coli* est également une cause fréquente d'infections urinaires acquises en milieu communautaire (**Ronald, 2002**).

*P. aeruginosa* et *A. baumannii* sont des pathogènes opportunistes, souvent responsables d'infections pulmonaires et de bactériémies sévères, notamment dans les unités de soins intensifs. Ces infections sont à l'origine de mortalité et de morbidité élevées partout dans le monde (**Rossolini et al., 2007**). Leur traitement est rendue plus complexe en raison de la capacité des bactéries à développer une variété de mécanismes de résistance à de nombreux agents thérapeutiques. De nombreux auteurs ont décrit ce phénomène comme la fin de l'ère des antibiotiques (**Taubes, 2008**).

La fréquence des bacilles à Gram négatif est le témoin d'une forte contamination de l'environnement hospitalier, et communautaire par ces bactéries, et de l'inefficacité des mesures visant à limiter leur dissémination (**Veyssier, 1995**). Au cours des dix dernières années, nous avons constaté une importante augmentation de la résistance aux antibiotiques en particulier chez les bacilles à Gram négatif (**Baba Ahmed-Kazi Tani et Arlet, 2014**).

Selon l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé (**afssaps, 2007**), les infections urinaires sont une des causes les plus fréquentes d'infections bactériennes. La prévalence de la maladie dépend de multiples facteurs, notamment de l'âge et du sexe du patient.

*E. coli* vient largement en tête avec 60 à 90 % des cas. Après *E. coli*, les trois espèces bactériennes jouant un rôle significatif sont *Proteus mirabilis*, les entérocoques et *Klebsiella* spp.

La résistance aux  $\beta$ -lactamines chez les entérobactéries est dominée par la production de BLSE. Les souches productrices de ces enzymes sont souvent à l'origine d'infections potentiellement sévères aussi bien en milieu hospitalier que communautaire (**Tagajdid et al., 2010 ; Baba Ahmed-Kazi Tani et Arlet, 2014**).

Plusieurs gènes et déterminants génétiques identifiés chez les entérobactéries sont responsables de cette résistance.

Nos résultats pour les souches d'*E. coli* montrent une résistance de 100% vis-à-vis de l'association amoxicilline/acide clavulanique. On note également une résistance de 100% à la céfalotine, la ticarcilline et la tobramycine, de 70,87% à l'aztréonam, de 84,37% au triméthoprim/sulfaméthoxazole, et de 81,25% au Sulfamide SSS. Un taux faible de résistance est observé avec l'ofloxacine (9,37 %), l'acide nalidixique (31,25 %), et la ciprofloxacine (21,87 %). Ces résultats sont comparables à ceux obtenus au Maroc par **Tagajdid et al., (2010)**, à la suite d'une étude sur des patients consultants et hospitalisés. Dans l'étude de **Fabre et al., (2010)** réalisée sur des souches d'*E. coli*, les résultats rapportés montrent une résistance un peu moins importante que celle de nos souches, avec des taux de sensibilités variables : 57% pour l'ampicilline, 73% pour l'amoxicilline/acide clavulanique, 96% pour le céfixime, 98% pour le céftriaxone, 96% pour la gentamicine, 82% pour l'acide nalidixique, 89% pour la ciprofloxacine et 98% pour la fosfomycine.

Concernant la famille des  $\beta$ -lactamines, on note pour les souches de *K. pneumoniae* et *K. oxytoca* une résistance de 100% à la céftazidime, la céfotaxime, la céfalotine et à l'amoxicilline/acide clavulanique, ainsi que pour la ticarcilline, la tobramycine, la gentamicine, les sulfamides (SSS) et la tétracycline. Ces résultats sont légèrement supérieurs à ceux obtenus par **Labid et al., (2014)**, qui ont réalisé une étude sur l'hémoculture où plusieurs souches de *K. pneumoniae* ont été isolées et évaluées pour leur résistance aux antibiotiques. Des taux de résistance élevés ont été observés chez *K. pneumoniae* pour les céphalosporines : la ticarcilline (95,83%), suivi de la céfazoline et l'amoxicilline/acide clavulanique (87,5%), enfin, la céfotaxime, la céftazidime, la céftriaxone et l'aztréoname (83,33%). Pour les aminosides, le taux le plus important a été observé pour la gentamicine, (83,33%), suivi de l'Amikacine (79,16%). Ces taux sont légèrement élevés par rapport à ceux obtenus dans une étude réalisée par **Belbel et al., (2014)**,

mais restent beaucoup plus faibles que les taux rapportés par **Nedjai et al., (2012)** à l'hôpital Ibn Rochd.

Les souches de *P. mirabilis* ont présenté une résistance de 100% à l'amoxicilline/acide clavulanique, l'aztréonam et la ticarcilline, ainsi que pour le sulfamide (SSS), la colistine et la tétracycline. Des taux élevés de résistance sont observés pour l'ofloxacine, l'acide nalidixique et le triméthoprim/sulfaméthoxazole. Ces taux de résistance sont élevés par rapport aux taux rapportés par **Mahamat et al., (2006)**.

Dans notre étude, les souches d'*E. cloacae* sont résistants aux C3G avec les pourcentages suivants: Céftriaxone (50%), Céfotaxime (70%) et Céftazidime (60%). Ces taux sont élevés par rapport à ceux rapportés par une étude récente de **Nedjai et al., (2013)**, dans la région d'Annaba (47,6%), mais sont proches de ceux rapportés par l'étude de **Khennouchi et al., (2015)**, où les taux de résistance sont respectivement de 66,6%, 66,6% et 50% pour les mêmes antibiotiques. Les résultats pour le reste des antibiotiques testés sont comparables à ceux obtenus dans cette étude. Les souches d'*E. aerogenes* étaient plus résistantes vis-à-vis de la majorité des antibiotiques.

L'analyse du profil de la résistance des souches de *S. marcescens* montre des taux de résistance très élevés pour certains antibiotiques. Un pourcentage de 100% est observé pour la céfalotine, l'aztréonam, la ticarcilline, l'amikacine, l'ofloxacine, l'acide nalidixique, la ciprofloxacine et à la colistine. Ces souches restent sensibles à la céftazidime, la céfotaxime et la céftriaxone.

Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par **Batah et al., (2015)**, dans une étude comparative entre des souches isolées dans les régions de Constantine et de Skikda. Nos souches ont montré une forte résistance pour certains antibiotiques comme pour le cas des souches isolées à Skikda (100% de résistance) et une sensibilité vis-à-vis d'autres antibiotiques comme pour le cas des souches isolées à Constantine ainsi que des souches communautaires utilisées dans cette étude. Nos résultats sont également comparables à ceux obtenus par **Labid et al., (2014)**.

Dans une étude épidémiologique effectuée sur des souches de *P. aeruginosa* isolées à l'est de l'Algérie par **Meradji et al., (2015)**, le taux de résistance aux  $\beta$ -lactamines à savoir la ticarcilline, la céftazidime, la ticarcilline/acide clavulanique et l'aztréonam étaient respectivement 61,25% ; 56,25% ; 56,25% ; 41,25% et 36,25%. Ces résultats s'accordent avec notre qui sont, respectivement, 68,75%, 64,06%, 65,62% et 42,18% pour ces mêmes antibiotiques.

Dans cette même étude le taux de résistance pour la ciprofloxacine, la colistine et la gentamycine étaient respectivement 43,75% ; 25% et 21,75%. Pour les deux premiers antibiotiques les taux que nous avons obtenus sont inférieurs à 9,37% et 7,82%. Quant à la gentamycine, la moyenne de résistance est de 37,5% et reste proche de celle obtenue par **Meradji et al., (2015)**, ainsi que **Touati et al., (2012)**.

En ce qui concerne les souches d'*A. baumannii*, on note une résistance de 100% à la céftazidime, la ticarcilline, la ticarcilline/acide clavulanique, le sulfamide (SSS) et à la tétracycline. Une résistance importante est obtenue avec l'aztréonom (87%), la pipéracilline (90,47%), le tobramycine (61,90%), l'amikacine (52,38%), la gentamicine (76,19%), la ciprofloxacine (80,95%) et le triméthoprime/sulfaméthoxazole (71,42%). Ces résistances sont plus élevées que celles obtenues par **Touati et al., (2012)**, mais restent comparables aux résultats obtenus par **Ramoul et al., (2013)** en Algérie, **Bayrem et Balci, (2006)** en Turquie et **Hassanzadeh et al., (2009)** en Iran.

Néanmoins ces souches restent sensibles à la colistine, à la fosfomycine et au chloramphénicol.

#### ❖ **Evaluation de l'activité antibactérienne des molécules de sulfamides innovantes :**

Dans ce travail, deux nouvelles séries synthétiques de sulfamides **1a-d** et **2a-f** ont été testées pour évaluer, *in vitro*, leur activité antibactérienne vis-à-vis de 262 souches cliniques à Gram positif et à Gram négatif. Parallèlement, cinq souches de référence ont été utilisées : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

L'évaluation de l'activité antibactérienne a été réalisée qualitativement en mesurant les diamètres des zones d'inhibition, et quantitativement en déterminant les CMI, CMI<sub>50</sub> et CMI<sub>90</sub>. Une cinétique d'évolution de la CMI a été réalisée afin de caractériser l'effet et l'évolution de l'activité antibactérienne des molécules vis-à-vis des souches cliniques.

Un test d'évaluation de la stabilité structurale et de l'activité antibactérienne des nouvelles molécules **1a-d** et **2a-f** a été réalisé.

La série **1a-d** est composée de molécules aromatiques. La série **2a-f** est composée de molécules linéaires **2a-c** et de molécules cycliques **2d-f**.



Pour la deuxième série, chaque couple de molécules (**2a-d** ; **2b-e** et **2c-f**) présente des structures identiques ; la différence réside uniquement dans la cyclisation au niveau de la molécule cyclique par rapport à la molécule linéaire.

L'évaluation, *in vitro*, de l'activité antibactérienne des sulfamides **1a-d** a mis en évidence une activité antibactérienne importante vis-à-vis des souches à Gram positif à savoir *S. aureus* et *E. faecalis*. Les diamètres des zones d'inhibition respectifs sont de  $22,15 \pm 6,22$  et  $24 \pm 0,63$  mm avec la molécule **1a**. Les CMI pour les souches de *S. aureus* varient entre 4 et 512  $\mu\text{g/ml}$  pour les quatre molécules **1a-d** ; les pourcentages d'inhibition sont importants et varient entre 80 et 82,5 %. Pour les souches d'*E. faecalis* les CMI varient entre 1 et 8  $\mu\text{g/ml}$  avec des pourcentages d'inhibition de 100%. En ce qui concerne les CMI<sub>50</sub> et CMI<sub>90</sub>, elles sont faibles, ce qui prouve la sensibilité des souches cliniques vis-à-vis de ces molécules.

La molécule **1a** a donné le meilleur résultat avec les souches à Gram positif, et aucun résultat avec les souches à Gram négatif.

Les molécules **1b-d** ont donné une bonne activité antibactérienne avec la majorité des souches cliniques à Gram négatif mis-à-part *S. odorifera* et *C. freundii* qui sont résistantes. Les diamètres des zones d'inhibition varient entre  $17,16 \pm 1,09$  mm pour les souches d'*E. coli* avec la molécule **1c** et  $23,85 \pm 1,06$  mm pour les souches d'*A. baumannii* avec la molécule **1b**. Les CMI varient entre 32 et 512  $\mu\text{g/ml}$  pour les souches les plus résistantes aux antibiotiques standards à savoir *E. coli*, *K. pneumoniae* et *K. oxytoca*. Les CMI sont faibles et varient entre 0,5 et 64  $\mu\text{g/ml}$  pour le reste des souches à Gram négatif.

Les pourcentages d'inhibition sont de 50 et 62,6% pour les souches *E.coli*, *K. pneumoniae* et *K. oxytoca* et de 100% pour le reste des souches. Les CMI<sub>50</sub> et CMI<sub>90</sub> sont également faibles confirmant ainsi l'intérêt des nouvelles molécules.

Lorsque les composés sont comparés les uns aux autres, la molécule **1b** s'avéré être la plus active et à de faibles concentrations vis-à-vis des souches étudiées suivie de la molécule **1c**. La molécule **1b** porte le fluorophenyl et la molécule **1c** porte le phenyl seul. Cette activité peut être attribuée à la présence de donneurs d'électrons et des groupes attracteurs ; la taille et la forme de la molécule, peuvent, également, influencer l'activité antibactérienne sélective (**Becheker et al., 2014**). Les substituants aromatiques tel que le fluor, améliorent la biodisponibilité et augmentent la puissance de l'activité antibactérienne.

Selon **Kumar et al., (2013)** et **Becheker et al., (2014)**, il a été conclu que la présence du fragment fluor, outre le groupement phényle, est essentiel pour une activité antibactérienne

élevée. En effet, ces auteurs indiquent dans leurs études que la présence du noyau phényle lié au fragment sulfamide augmente le potentiel antimicrobien des composés synthétisés contre les souches microbiennes testées.

Les molécules **2a-f** de la deuxième série de sulfamides ont donné une très bonne activité antibactérienne avec la totalité des souches cliniques testées.

Concernant les souches à Gram positif, le diamètre le plus élevé a été obtenu avec la molécule **2a** pour *S. aureus* avec  $19 \pm 1,65$  mm ; pour les souches d'*E. faecalis* les diamètres de zones d'inhibitions varient entre  $20,33 \pm 0,51$  mm (molécule **2e**) et  $21,66 \pm 0,51$  mm (molécule **2c**). Les CMI sont faibles et varient entre 4 et 256  $\mu\text{g/ml}$  pour *S. aureus* ; elles sont plus faibles pour *E. faecalis* et varient entre 0,5 et 8  $\mu\text{g/ml}$ . Les pourcentages d'inhibition sont également élevés et varient entre 75 et 92,5% pour *S. aureus* et 100% pour *E. faecalis*. Les CMI<sub>50</sub> et CMI<sub>90</sub> sont également très faibles.

Toutes les souches à Gram négatif étaient sensibles aux six nouvelles molécules. Les diamètres des zones d'inhibition varient en général entre  $18,85 \pm 1,97$  mm pour les souches d'*E. coli* (molécule **2f**), et  $25,09 \pm 1,09$  mm pour les souches d'*A. baumannii* (molécule **2a**).

Les CMI sont faibles variant entre 0,5 et 128  $\mu\text{g/ml}$  pour les souches d'*E. coli* qui se sont montrées les plus résistantes, et entre 0,5 et 8  $\mu\text{g/ml}$  pour le reste des souches à Gram négatif. Les pourcentages d'inhibition varient entre 84% et 100% pour *E. coli* et *K. pneumoniae* respectivement, pour le reste des souches cliniques il est de 100%. Les CMI<sub>50</sub> et CMI<sub>90</sub> sont faibles ce qui prouve l'efficacité des nouvelles molécules.

Il est à noter que les molécules linéaires **2a-c** donnent de meilleurs résultats par rapport à ceux obtenus avec les molécules cycliques **2d-f**.

Dans une étude menée par **Genç et al., 2008**, trois dérivés de sulfamides ont été testés pour leur activité antimicrobienne dans le but de révéler les principaux composés susceptibles d'être utilisés pour le développement de nouveaux agents antimicrobiens [(2-Hydroxy-4-nitro-phenyl)-4-methyl-benzenesulfonamide], [N-(2-Hydroxy-5-nitro-phenyl)-4-methyl-benzenesulfonamide] et le [N-(5-Chloro-2-hydroxy-phenyl)-4-methyl-benzenesulfonamide]. Les résultats de l'étude ont montré que les dérivés de sulfamides I et II sont assez efficaces avec un effet inhibiteur élevé sur les bactéries à Gram positif à savoir *S. aureus*, *N. asteroides*, *N. farcinia* et *B. subtilis*. Sur les bactéries à Gram négatif, aucun effet inhibiteur significatif n'a été observé sur *E. coli*,

*P. aeruginosa*, *E. cloacae*, ainsi que sur les levures et les moisissures. Pour *S. aureus* les diamètres des zones d'inhibition varient entre 16 - 25 et 14 - 22mm pour la molécule I et entre 14 - 22 mm pour la molécule II. Les CMI varient entre 32 et 512 µg/ml, et la CMI la plus efficace qui a été retenue est de 500 µg/ml (**Genç et al., 2008**). Contrairement à ces molécules, les notre, qui portent presque les mêmes radicaux, montrent une activité antibactérienne aussi bien sur les bactéries à Gram positif que sur les bactéries à Gram négatif. Seule la molécule **1a** a donné des résultats comparables à ceux obtenus dans cette étude, en inhibant uniquement les bactéries à gram positif avec des diamètres de zones d'inhibition et des CMI similaires.

Les résultats obtenus par **Badampudi et al., (2014)**, pour une série de sulfamides contenant des hétérocycles montrent des CMI variant entre 2 et 20,46 µg/ml pour la souche de *S. aureus* NCCS 2079 et entre 3 et 35,16 µg/ml pour la souche d'*E. coli* NCCS 2065. Ces résultats sont meilleurs que ceux obtenus pour *S. aureus* avec les deux séries de notre étude et sont comparables à ceux obtenus avec la deuxième série de molécules **2a-f** pour les souches d'*E. coli*.

**Tommasino et al., (2011)**, ont combiné des ions métalliques aux sulfamides. Les résultats de la CMI obtenus pour *P. aeruginosa* sont égales ou supérieures à 128 mg/L, pour *E. coli*, *S. aureus* et *K. pneumoniae* sont comprises entre 32 et 128 mg/L. Les résultats obtenus dans notre étude avec ces espèces bactériennes restent bien plus importants avec des CMI plus faibles.

**Ozdemir et al., (2009)** ont réalisé une étude sur six dérivés de sulfamides et leur complexes nickel(II) et cobalt(II). L'activité antibactérienne a été réalisée sur plusieurs souches de références à Gram positif et à Gram négatif, parmi ces souches, *S. aureus* ATCC 25923 et d'*E. coli* ATCC 11230 qui ont donné des CMI qui varient entre 220 et 413 µg/ml et entre 220 et 610 µg/ml respectivement. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus pour les molécules **1a-d** avec les souches de *S. aureus* mais qui restent légèrement plus actives avec des CMI qui ne dépassent pas 512 µg/ml. Pour *E. coli*, nos résultats restent meilleurs avec des CMI plus faibles variant entre 32 et 512 µg/ml.

**Dogruer et al., (2010)** ont synthétisé une série de dérivés de pyridazines portant l'urée, la thiourée, et des groupements sulfamides (4 dérivés), et ont évalué leur activité antibactérienne sur des souches de référence ainsi que sur des souches cliniques. En ce qui concerne les 4 dérivés de sulfamides, les CMI sont de 4 µg/ml pour les 3 premières molécules et de 16 µg/ml pour la 4<sup>ème</sup> molécule pour la souche d'*E. coli* ATCC 25922. Pour la souche clinique d'*E. coli* la CMI varie entre 32 et 128 µg/ml. La CMI est de 128 µg/ml pour la souche de référence ainsi que la

souche clinique de *P. aeruginosa* ; pour la souche *S. aureus* ATCC 29213, elle est de 4 µg/ml pour les 4 molécules et de 128 µg/ml pour la souche clinique de *S. aureus*. Ces molécules portent les mêmes radicaux que nos molécules à savoir le phenyl, le benzène, le methyl et le methoxy et présentent des combinaisons semblables entre ces radicaux. L'activité antibactérienne vis-à-vis de ces souches est comparable aux résultats obtenue avec la série **2a-f**, sauf que pour la souche de *P. aeruginosa* nos résultats sont nettement meilleurs.

Une série de 8 nouvelles molécules de N-acylsulfonamides développées par **Massah et al., (2008)** a été testée sur des souches cliniques, à savoir *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus* et deux souches de références *S. aureus* ATCC 25922 et *P. aeruginosa* ATCC 27853. Les CMI varient entre 2 et 256 µg/ml pour les souches d'*E. coli* et atteignent 1000 µg/ml avec certaines molécules. Elles varient entre 2 et 1000 µg/ml pour les souches cliniques ainsi que la souche de référence de *S. aureus*, et entre 8 et 1000µg/ml pour la souche de référence de *P. aeruginosa*. Ces résultats montrent que nos molécules ont une activité antibactérienne plus intéressante vis-à-vis des souches de référence ainsi que des souches cliniques avec des CMI beaucoup plus faibles.

Il a été décrit dans la littérature que les entérocoques sont naturellement résistants aux sulfamides. Toutefois, nos résultats ont montré la sensibilité d'une souche de référence d'*E. faecalis* ATCC 29212 et de six souches cliniques d'*E. faecalis* vis-à-vis des deux séries de sulfamides **1a-d** et **2a-f**. Ces résultats sont comparables à d'autres études réalisées dans le but d'évaluer l'activité antibactérienne de nouveaux sulfamides sur des souches d'entérocoques à savoir *E. faecalis* et *E. faecium*. Parmi ces études **Tommasino et al., (2011)**, ont combiné des ions métalliques aux sulfamides ; les CMI obtenus sont supérieures ou égales à 128 mg/L pour *E. faecalis*. **Dogruer et al., (2010)**, ont également évalué une série de dérivés de pyridazines portant l'urée, la thiourée, et des groupements sulfonamide sur *E. faecalis* ATCC 29212 et un isolat d'*E. faecalis* ; les CMI obtenues varient entre 4 et 8 µg/ml pour la première souche et sont égales à 128 µg/ml pour la seconde souche. Le résultat obtenu pour la souche de référence est comparable à celui obtenus avec nos deux séries de molécules, par contre nos résultats pour les souches cliniques sont meilleurs avec des CMI variant entre 0,5 et 8 µg/ml. **Massah et al., (2008)** ont également indiqué que des souches cliniques d'*E. faecium* ont montré une sensibilité vis-à-vis d'une série de 8 molécules de N-acylsulfonamides qui a donné des CMI variant entre 64 et 1000 µg/ml.

Certaines souches cliniques, à savoir *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* et *P. aeruginosa*, ont montré une résistance vis-à-vis de quelques molécules de sulfamides testées dans notre étude. Cette résistance peut être due, soit à des mutations dans le gène chromosomique de la DHPS (*folP*) qui entraînent une diminution de l'affinité de la DHPS pour les sulfamides, soit à l'acquisition de gènes alternatifs (*sul*) qui codent pour des DHPS avec une affinité réduite aux sulfamides (**Baba Ahmed-Kazi Tani et Arlet, 2014**). En Algérie, seuls les gènes *sul1* et *sul2* ont récemment été rapportés chez des souches d'entérobactéries. Le gène *sul1* est généralement moins fréquent que le gène *sul2* (**Baba Ahmed-Kazi Tani et al., 2013**).

### ❖ Evaluation de la cytotoxicité des nouvelles molécules de sulfamides :

L'étude de la toxicologie sert la société à bien des égards, non seulement la protection des humains et de l'environnement contre les effets nocifs des substances toxiques, mais aussi pour faciliter le développement de substances toxiques plus sélectives comme les anticancéreux, les drogues cliniques et les pesticides (**Timbrell, 2000 ; Hodgsona, 2004**).

Lors de la recherche ou la découverte d'une nouvelle molécule ou d'un nouveau médicament ou lors de la synthèse de composés anticancéreux puissants et sélectifs, un test de cytotoxicité préliminaire est nécessaire. Parmi les tests disponibles, l'évaluation de la létalité sur l'*Artemia salina* (crevette de saumure). Il fait partie des tests les plus fréquemment utilisés pour l'étude de la toxicité des xénobiotiques, des pro-médicaments, des toxines fongiques, des extraits de plantes, des métaux lourds et des pesticides (**Hodgson et Smart, 2001**).

La létalité *in vivo* d'un organisme zoologique simple, comme *A. salina*, pourrait être utilisée comme un outil simple pour le dépistage des composés physiologiquement actifs, avec une réponse biologique simple à mesurer (létalité), car il n'y a qu'un seul critère : organisme mort ou vivant. Cet essai biologique détecte un large éventail de molécules chimiques à plusieurs activités biologiques (**Asif et al., 2013**). Il a été proposé par **Michael et al., (1956)**, et est considéré comme un outil utile pour l'évaluation préliminaire de la toxicité (**Reddy, 2009**).

Il a été démontré que le test de létalité sur *A. salina* est raisonnablement en corrélation avec la cytotoxicité ainsi que d'autres propriétés biologiques (**He et al., 2001 ; Asif et al., 2013**). *A. salina* a été utilisée dans divers systèmes d'essais biologiques à savoir, le dépistage des toxines naturelles et le dépistage général de substances bioactives (**Anderson et al., 1991**). Il peut être

associé à d'autres tests tels que les tests de génotoxicité. Ce test fournit une réponse cytotoxique dose-dépendante (**Badisa et al., 2009**).

La cytotoxicité des deux nouvelles séries de sulfamides **1a-d** et **2a-f** a été évaluée en utilisant le protocole de **Meyer et al., (1982)**, vis-à-vis des nauplii d'*A. salina*. La technique se base sur la détermination de la valeur de la CL<sub>50</sub> en µg/ml de composés actifs présents dans le milieu.

Les résultats obtenus pour la série **1a-d** montrent que seule la molécule **1a** a affichée une activité cytotoxique puissante vis-à-vis des nauplii d'*A. salina*, tandis que les autres molécules **1b-d** n'ont pas d'effet cytotoxique. La CL<sub>50</sub> est de 18,29 pour la molécule **1a**, et elle est de 29,63 ; 66,1 et 20,99 respectivement pour les autres molécules.

En ce qui concerne les molécules de la série **2a-f**, aucun effet cytotoxique n'a été obtenu avec les six molécules. Les CL<sub>50</sub> respectifs pour les trois molécules linéaires **2a-c** sont : 712,7 ; 892,3 et 524,5. Pour les trois molécules cycliques **2d-f** les CL<sub>50</sub> sont 59,64 ; 142,3 et 292,3 respectivement.

Les molécules qui n'ont pas d'effet cytotoxique sur les nauplii d'*A. salina*, ne présentent pas, par conséquent, d'effet cytotoxique sur les cellules humaines **Geran et al., (1972)**, ce qui favorise leur utilisation en tant qu'agents antibactériens.

Plusieurs chercheurs s'intéressent à l'évaluation de l'effet cytotoxique des nouvelles molécules de synthèses par le test de létalité des nauplii d'*A. salina*, vue l'importance des informations qu'il peut fournir, à savoir la mise en évidence de l'activité biologique de la molécule d'où l'orientation de son activité vers l'activité anti-tumorale par exemple suite à son effet cytotoxique, ou bien la poursuite de caractérisation des molécules antibactériennes.

Parmi ces chercheurs **Chohan et al.**, associent toujours la synthèse et l'évaluation de l'activité antibactérienne des nouveaux dérivés de sulfamides à l'évaluation de leur effet cytotoxique par ce test ; plusieurs travaux ont été publiés ; plusieurs composés ont montré une bonne activité antibactérienne, néanmoins certains se sont montrés cytotoxiques (**Chohan et al., 2005 ; Chohan et Supuran, 2008 ; Chohan, 2009 ; Chohan et al., 2010 ; Chohan et Shad, 2012**).

D'autres auteurs utilisent ce test pour évaluer l'effet cytotoxique de certains extraits de plantes médicinales (**Pimenta et al., 2003 ; Latha et al., 2007 ; Luxmini et al., 2015**).

Une étude réalisée par **Bartel, (1976)** a rapporté que le site d'action des sulfamides au niveau des nauplius d'*A. salina* semble correspondre à l'étape de la déshydratation de l'acide malique (déshydrogénase) dans la réaction de production d'ATP nécessaire pour la formation des acides nucléiques (purines et pyrimidine) qui se traduit par l'accumulation d'oxaloacétate dans le cytoplasme.

### ❖ **Evaluation de l'effet génotoxique des nouvelles molécules de sulfamides :**

Le champ d'application des études sur la mutagénèse s'est considérablement élargi lorsque la notion de cancérogénèse lui a été associée ; ce concept a été introduit par **Ames et al., (1973)**. La détection des génotoxines est devenue de plus en plus importante depuis la découverte de mutagènes très puissants dans les aliments cuits, et la démonstration ultérieure de leur cancérogénicité chez les rongeurs (**Sugimura, 1988**). Il semble maintenant que notre environnement contient un grand nombre d'agents mutagènes, ainsi les humains vivent entouré par des substances mutagènes/cancérogènes (**Sugimura, 1985 ; Ames, 1983 ; Ames et al., 1987**). Par conséquent, l'importance de l'évaluation des substances mutagènes à la fois qualitativement et quantitativement est devenue indispensable (**Hayatsu, 1999**).

Selon les règlements de l'Union européenne (**EEC, 1967**), toutes les nouvelles substances chimiques doivent être notifiées avant leur introduction sur le marché. Une des conditions de la notification est que les propriétés toxicologiques doivent être examinées y compris la mutagénicité (**Broschinski et al., 1998**).

Chaque année, il apparaît entre 300 et 450 nouvelles molécules qui doivent être évaluées en terme de leur potentiel cancérogène. L'intérêt des tests de mutagénèse provient du fait que 4 à 10 % des cancers proviendraient de l'exposition à des produits industriels.

La recherche d'une génotoxicité est au premier rang des recherches d'effets mutagènes. Les tests de mutagénèse fournissent une information sur la génotoxicité directe d'un agent chimique donné. Un résultat positif dans l'un de ces tests, montre que le risque cancérogène est grand. La promotion de l'utilisation des tests de génotoxicité est indispensable (**Binet, 2001**).

L'évaluation de la génotoxicité des deux séries de sulfamides **1a-d** et **2a-f** a été réalisée en utilisant deux tests, à savoir le test d'Ames ou le test de mutation réverse utilisant trois souches

de *S. typhimurium* TA100, TA98 et TA1535 avec et sans activation métabolique (S9), ainsi que le SOS Chromotest basé sur la réponse SOS (système de réparation SOS) combinée à l'induction de la  $\beta$ -galactosidase et de la phosphatase alcaline.

Avec le test d'Ames ainsi que le SOS Chromotest, la série **1a-d** de sulfamides a montré que les trois molécules **1a**, **1b** et **1d** ont exprimé un effet génotoxique ou mutagène. Seule la molécule **1c** ne s'est pas montrée génotoxique. Cette molécule porte uniquement un cycle phenyl, contrairement aux trois autres molécules qui portent un cycle phenyl combiné au methoxy pour la molécule **1a**, au fluor pour la molécule **1b** et à l'ethyl pour la molécule **1d**.

Les trois molécules linéaires **2a-c** de la deuxième série de sulfamides n'ont pas montré d'activité génotoxique, ni avec le test d'Ames (avec et sans activation métabolique), ni avec le SOS Chromotest. Les trois molécules cycliques **2d-f** de la même série de sulfamides, ont par contre, exprimé un effet génotoxique aussi bien avec le test d'Ames qu'avec le SOS Chromotest.

Plusieurs études ont été réalisées sur les substances chimiques susceptibles de présenter un effet génotoxique. **Quillardet et Hofnung, (1993)**, ont réunie tous les résultats sous forme de revue où des substances ont été évaluées pour leur potentiel génotoxicité avec le test d'Ames ainsi que le SOS Chromotest. Parmi les résultats obtenus, les composés contenant le benzène, le fluor et l'oxyde se sont avérés génotoxiques, ainsi que les composés contenant le phenyl, l'ethyl, le methyl et le fluor combinés à d'autres composés.

**Broschinski et al., (1998)**, ont réalisé une analyse comparative sur un total de 776 nouvelles substances commercialisées et notifiées par le gouvernement allemand entre 1982 et 1997 afin de caractériser leur effet génotoxique. Plusieurs méthodes, *in vitro*, ont été réalisées, tel que les tests de mutations de gènes bactériens. Les résultats montrent pour 36 substances, un effet génotoxique qui est en corrélation avec les propriétés chimiques des molécules testées, telle que la présence de substituants methoxy ou éthoxy. D'autre part, il a été également démontré, pour d'autres substances, que la présence de certains composés chimiques tels que le cycle benzène, les substitutions N-amide et N-N'-amide, les hétérocycles et les structures aliphatiques insaturées, sont responsables d'un effet génotoxique. Toutefois, la présence de ces composés n'est pas obligatoirement corrélée avec le potentiel génotoxique ; ceci dépend de leur position sur la molécule. Ces travaux ont montré, également, la possibilité d'utiliser ces techniques en routine dans des systèmes d'évaluation de la génotoxicité *in vitro*.



Conformément aux travaux de **Broschinski et al., (1998)** la molécule **1a** qui comporte un methoxy-phenyl est génotoxique. La molécule **1b** qui comporte un fluor combiné au phenyl et la molécule **1d** qui comporte une combinaison phenyl-ethyl ont montré une génotoxicité expliquée par la présence du fluor ainsi que de l'ethyl et le methoxy déjà reconnus génotoxiques et mutagènes par **Quillardet et Hofnung, (1993)**.

Parmi les molécules que nous avons testé, les trois molécules cycliques **2d-f** (hétérocycles), portant les substitutions N-N'-amide ont montré un effet génotoxique. Ce résultat confirme ceux obtenus par **Broschinski et al., (1998)**.

Une étude sur la synthèse, la caractérisation et l'évaluation pharmacologique de certains sulfamides contenant des motifs hétérocycliques, indique que tous les composés ayant une activité mutagène élevée possèdent un fragment 6-méthoxy benzothiazole (**Badampudi et al., 2014**).

**González-Álvarez et al., (2013)** ont évalué l'effet des dérivés de complexes de sulfamides avec des ligands mixtes de cuivre (II), sur les liaisons et le clivage de l'ADN, sur la génotoxicité et sur l'activité anticancéreuse. Ils ont conclu que la génotoxicité du Cu (II) des complexes de sulfamides est liée aux substituants sur le noyau benzothiazole (les N- substitutions en présence du methyl et de l'ethyl en particulier). Le benzothiazole du sulfamide semble jouer un rôle majeur dans la gouvernance des interactions avec l'ADN et/ou la pénétration cellulaire de la molécule.

La molécule **1c** portant un phenyl non couplé à d'autres composants ainsi que les molécules linéaires **2a, 2b et 2c** n'ont montré aucun effet mutagène (génotoxique) avec le test d'Ames, et le SOS Chromotest bien que ses dernières comportent des cycles aromatiques seuls ou combinés avec des substitutions N-N'. Ceci est démontré par les travaux de **Broschinski et al., (1998)**, où certains résultats montrent qu'il n'y a pas de corrélation entre les composés d'une substance et l'effet génotoxique.

Ceci a été également démontré par **Silva et al., (2015)**, en évaluant la génotoxicité d'un sulfonamide chalcone le N-{4-[3-(4-nitrophenyl) prop-2-enoyl]phenyl}-benzenesulfonamide. Bien que cette molécule comporte plusieurs composés chimiques ayant été déjà déclarés génotoxiques/mutagènes, cette dernière n'a pas montré d'effet génotoxique avec le test d'Ames (TA100 et TA98).

Plusieurs laboratoires ont rapporté pour la pénicilline et la ciprofloxacine un effet mutagène mis en évidence par le test d'Ames et le SOS Chromotest ; la gentamicine, par contre, est non génotoxique (**Quillardet et Hofnung, 1993**).

Les souches de *Salmonella* TA98, TA100 et TA1535 sont des souches sensibles qui sont couramment utilisées pour la détection des mutations frame-shift (décalage du cadre de lecture) et les mutations par substitution de paires de bases (**Lolo et al., 2006**). Un composé est considéré comme agent mutagène si l'échantillon testé a produit une réponse, qui était au moins deux fois plus élevée que celle trouvée avec le contrôle négatif avec une réponse dose-dépendante (**Maron et Ames, 1983**).

La toxicité est un événement relatif qui dépend non seulement des propriétés toxiques de la substance chimique et la dose administrée, mais aussi sur des variations individuelles et interspécifiques dans le traitement métabolique de la substance chimique, d'où l'importance d'utiliser un système d'activation métabolique pour le test d'Ames (**Hodgsona, 2004**).

Les systèmes d'activation métaboliques sont presque toujours utilisés dans les tests *in vitro*. Ils constituent un complément dans le cas où l'agent chimique, anodin par lui-même, devient génotoxique après métabolisation. Le plus connu consiste à induire la synthèse hépatique des microsomes puis de récupérer la fraction dite S9. C'est cette fraction qui est utilisée pour approcher, *in vitro*, les effets du métabolisme. (**Binet, 2001 ; Ku et al., 2007**).

Le S9 a également été préparé à partir de souris, d'hamsters, et d'autres animaux, mais le S9 du rat est le plus largement utilisé. Le S9 humain a également été utilisé, mais il n'existe actuellement aucune preuve qu'il soit plus efficace pour identifier des agents mutagènes ou prédire la cancérogénicité induite par rapport au S9 de rongeurs (**Ames et al., 1973 ; Beaune et al., 1985**).

Le SOS Chromotest est l'un des tests de mutagénicité les plus utilisés avec le test d'Ames. Il est basé sur l'utilisation de la souche *E. coli* PQ37. Ce test a permis de cibler et de mettre en évidence une large variété de produits chimiques (y compris les métaux lourds, les composés organiques et inorganiques) en raison de son aspect pratique (une courte période, une simple manipulation et une seule souche) par rapport au test d'Ames qui utilise plusieurs souches (**Quillardet et Hoffnung, 1993 ; Nam et al., 2012**).

Plusieurs chercheurs ont utilisé le SOS Chromotest afin de mettre en évidence l'effet génotoxique des nanoparticules d'or, d'argent, de zinc et de titanium (Nam *et al.*, 2012), la présence d'éventuels agents mutagènes dans l'environnement, particulièrement au niveau des sédiments et des eaux (Canada) (Langevini *et al.*, 1992 ; Bombardier *et al.*, 2001), ainsi que pour le contrôle de la sureté préclinique des médicaments et des extraits de plantes (De Meo *et al.*, 1992 ; Quillardet *et Hoffnung*, 1993).

Néanmoins, il est conseillé d'utiliser plusieurs tests de génotoxicité afin de pouvoir confirmer l'effet génotoxique d'une molécule ou d'un composé ; car plusieurs études ont montré qu'une molécule peut ne pas présenter de génotoxicité avec un test, et l'exprimer clairement avec un autre (Quillardet *et Hoffnung*, 1993 ; Broschinski *et al.*, 1998).



***CONCLUSION GENERALE  
ET PERSPECTIVES***

## *Conclusion Générale et perspectives*

L'usage abusif et inadapté des antibiotiques favorise l'apparition des souches résistantes, ce qui limite le nombre d'antibiotiques utilisables. A l'heure actuelle on assiste à une diminution, voir une raréfaction de nouvelles molécules antibactériennes actives. La synthèse de nouvelles molécules antibactériennes, en réponse à l'évolution croissante de la résistance bactérienne, est l'une des alternatives pour pallier aux insuffisances des antibiotiques disponibles.

Notre étude a porté sur 262 souches cliniques isolées à partir de différents types de prélèvements biologiques, ainsi que 5 souches de référence.

L'évaluation de la résistance bactérienne aux antibiotiques classiques a montré que la majorité des souches a développé une multirésistance, ce qui confirme le phénomène de propagation de la résistance.

Nos résultats ont montré que les deux nouvelles séries de sulfamides **1a-d** et **2a-f** testées dans ce travail possèdent une bonne activité antibactérienne à large spectre (bactéries à Gram positif et bactéries à Gram négatif, nosocomiales et communautaires). Une activité antibactérienne remarquable a été obtenue avec des souches cliniques d'*E. faecalis* ainsi que la souche de référence ; ces souches bactériennes sont connues pour être naturellement résistantes aux sulfamides.

L'évaluation de l'activité antibactérienne de la première série de sulfamide **1a-d** a montré un résultat intéressant vis-à-vis de la majorité des souches, excepté la molécule **1a** qui ne montre d'inhibition qu'avec les souches à Gram positif (*S. aureus* et *E. faecalis*).

La deuxième série de sulfamide **2a-f** a donné d'importants résultats vis-à-vis de la totalité des souches cliniques testées avec des diamètres de zones d'inhibition importants et des CMI intéressantes.

Les molécules linéaires **2a-c** ont donné les résultats les plus importants par rapport à ceux obtenus avec les molécules cycliques **2d-f** de la même série ainsi que les résultats de la première série **1a-d**.

La cinétique des CMI de 48 h a montré que l'inhibition des souches bactériennes par les deux nouvelles séries de sulfamides apparaît dès les premières heures d'incubation.

Les molécules testées ont présenté une activité antibactérienne comparable voir plus importante que celle obtenue avec le Bactrim (témoin 1) ; cette activité est meilleure par rapport au second témoin, le Sulfaguanidine, qui a présenté une forte résistance.

L'évaluation de la stabilité structurale et de l'activité antibactérienne des nouvelles molécules **1a-d** et **2a-f** pendant la période des essais (conservation à température ambiante, et à l'obscurité pendant 4 ans), n'a révélé aucune dégradation, structurale ou fonctionnelle, des dix molécules de sulfamides.

L'évaluation de l'effet cytotoxique des molécules, *in vitro*, par le test de létalité sur *A. salina* en déterminant la CL50, a montré que seule la molécule **1a** de la première série de sulfamide est cytotoxique.

Les tests de génotoxicité sont des tests spécifiques qui peuvent prédire le risque génotoxique mais aussi mutagène de certains composés au niveau moléculaire (ADN), ce qui entraîne de graves conséquences sur le génome suite à l'apparition de mutations, qui peuvent conduire à l'apparition d'un cancer. Le test d'Ames et le SOS Chromotest sont parmi les tests les plus simples, rapides et facilement adaptables pour l'évaluation de l'effet génotoxique d'un produit et ainsi la sûreté préclinique d'un médicament.

Pour le test d'Ames, les résultats obtenus pour la première série de sulfamides **1a-d**, montrent que les molécules **1a**, **1b** et **1d** ont un effet génotoxique avec une ou plusieurs souches de *S. typhimurium*. Seule la molécule **1c**, ne possédant que le radical phényle, ne présente aucun effet génotoxique que ce soit avec ou sans activation métabolique (S9).

En ce qui concerne la deuxième série de sulfamides **2a-f**, les molécules linéaires **2a-c** ne montrent aucun effet génotoxique contrairement aux trois molécules cycliques **2d-f** qui ont présentées un potentiel génotoxique, avec une ou plusieurs souches de *S. typhimurium*, avec ou sans activation métabolique (S9).

Les résultats obtenus par le SOS Chromotest confirment les résultats obtenus avec le test d'Ames.

Ainsi, la conclusion se résume aux points suivants :

- \* La résistance bactérienne et sa propagation au niveau des souches nosocomiales et communautaires posent un sérieux problème de santé public.
- \* Nous sommes devant un besoin pressant de développer de nouvelles molécules antibactériennes efficaces et sans risques sur la santé du consommateur.
- \* L'activité antibactérienne d'une nouvelle molécule dépend, essentiellement, de sa structure chimique.

- \* Une molécule qui ne présente pas de risque cytotoxique ne peut pas être déclarée comme sans risque sur la santé humaine avant d'effectuer des tests de génotoxicité.
- \* La génotoxicité donne une appréciation plus fiable de la sûreté préclinique d'une nouvelle molécule, car elle peut prédire les risques au niveau moléculaire c'est-à-dire au niveau de l'ADN, afin d'éviter le risque mutagène et par conséquent l'apparition d'éventuels cancers.

Seule la molécule **1c** de la première série **1a-d**, et les molécules linéaires **2a, 2b et 2c** de la deuxième série **2a-f**, ont présenté une bonne activité antibactérienne, ainsi que l'absence d'effet cytotoxique et génotoxique.

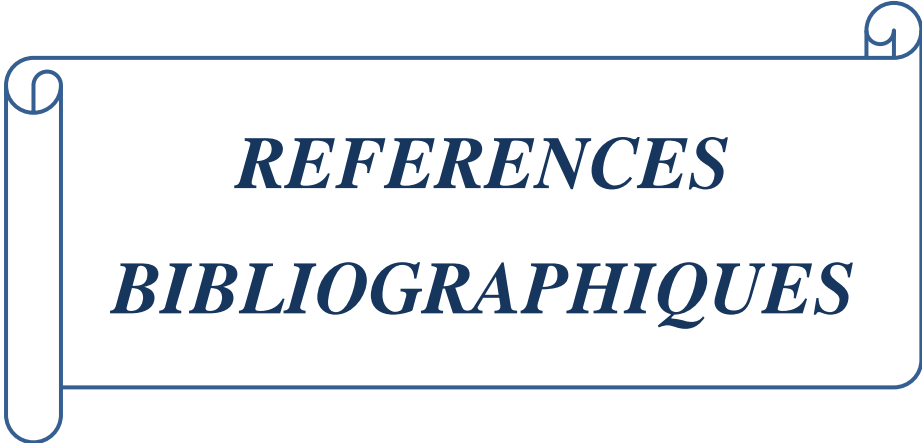
Ce travail ouvre les perspectives suivantes :

- Evaluation de l'activité antifongique et antiparasitaire, *in vitro*, des nouvelles molécules **1a-d** et **2a-f**.
- Evaluation de l'activité anti-infectieuse *in vivo* sur des modèles animaux.
- Etudes des gènes de résistance aux différents antibiotiques.
- Mise en évidence des gènes de résistance aux nouvelles molécules de sulfamides.
- Etude des mécanismes cellulaires, par microscopie électronique, de l'activité biologique de ces nouvelles molécules.
- Etude des mécanismes cellulaires et moléculaires de l'action des nouvelles molécules sur les souches d'*E. faecalis*.
- Approfondir les investigations du potentiel génotoxique par d'autres tests tel que, le test des comètes, le test d'aberrations chromosomiques...

*« On ne fait jamais attention a ce qui a été fait ; on ne voit que  
ce qui reste à faire »*

*Marie Curie*



A decorative border in the shape of a scroll, with a vertical strip on the left side and a horizontal strip at the top. The scroll is outlined in a dark blue color. The text is centered within the horizontal strip.

***REFERENCES***  
***BIBLIOGRAPHIQUES***

**Abbott W.S., (1925).** A method for computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.*, **18**: 265-267.

**Adesiyun A.A., Kaminjolo J.S., (1992).** Susceptibility to antibiotics of *Escherichia coli* strains isolated from diarrhoeic and non-diarrhoeic livestock in Trinidad. *Rev Elev Med Vet Pay*, **45**: 260-262.

**Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé (afssaps), (2007).** Diagnostic et antibiothérapie des infections urinaires bactériennes communautaires du nourrisson et de l'enfant. *Méd Mal Inf*, **37**: 645-663.

**Alam M., Ghiasuddin Sadat A., Muhammd N., Khan A.A., Siddiqui B.S., (2012).** Evaluation of *Viburnum grandiflorum* for its in-vitro pharmacological screening. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.*, **6(22)**: 1606-1610.

**Alifrangis M., Lusingu J.P., Mmbando B., Dalgaard M.B., Vestergaard L.S., Ishengoma D., Khalil I.F., Theander T.G., Lemnge M.M., Bygbjerg I.C., (2009).** Five-year surveillance of molecular markers of *Plasmodium falciparum* antimalarial drug resistance in Korogwe District, Tanzania: accumulation of the 581G mutation in the *P. falciparum* dihydropteroate synthase gene. *Amer J Trop Med Hyg*, **80**: 523-527.

**Alioua M.A., Labid A., Amoura K., Bertine M., Gacemi-Kirane D., Dekhil M., (2014).** Emergence of the European ST80 clone of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a cause of healthcare-associated infections in Eastern Algeria. *Med. Mal.*, **44(4)**: 180-183.

**Alkhatib R., (2010).** Etude phytochimique et activité cytotoxique des métabolites secondaires de *Ferula elaeochytris* Korovin et *Ferula lycia* Boiss (Apiacees). Chemical Sciences. Université du Droit et de la Santé - Lille II, France. Thèse de Doctorat, Sciences du médicament.

**Alluri V.K., Tayi V., Rao N., Sundararaju D., Mulabagal V., Hsin-Sheng T., Gottumukkaka S.V., (2006).** Biological screening of medicinal plants collected from Eastern Ghats of India using *Artemia salina* (Brine Shrimp Test). *Int J App. Sc. Eng*, **4**: 115-125.

**Ames B.N., Whitfield Jr. H.J., (1966).** Frameshift mutagenesis in *Salmonella*, Cold Spring Harbor Symp. *Quant. Bio.l*, **23**: 221-225.

**Ames B.N., Lee F.D., Durston W.E., (1973).** An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proc Natl Acad Sci USA*, **70**: 782-786.

**Ames B.N., Durston W.E., Yamasaki E. et al., (1973).** Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Proc Natl Acad Sci USA*, **70**: 2281-2285.

**Ames B.N., Magaw R., Gold L.S., (1987).** Ranking possible carcinogenic hazards. *Science*, **236(4799)**: 271-280.

**Amyes S.G.B., (2007).** Enterococci and streptococci. *Inter J Antimicrob Agents*, **3**: 43-52.

**Anand N., Wolff M.E., (1996).** Burger's medicinal chemistry and drug discovery. In Therapeutic Agents. 5<sup>e</sup> Edition. New York, Ed: J. Wiley & Sons, **2**: 527-544.

**Anderson J.E., Goetz C.M., McLaughlin J.L., Suffness M., (1991).** A blind comparison of simple bench-top bioassays and human tumor cell cytotoxicities as antitumor prescreens. *Phytochem Analys*, **2**: 107-111.

**Antri K., Rouzic N., Boubekri I., Dauwalder O., Beloufa A., Ziane H., Djennane F., Neggazi M., Benhabyles B., Bes M., Tazir M., Etienne J., Ramdani-Bouguessa N., (2010).** Forte prévalence des infections communautaires et nosocomiales à *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline et portant le gène de la leucocidine de Panton-Valentine dans l'Algérois. *Pathol Biol*, **58**: 15-20.

**Araj G.F., Uwaydah M.M., Alami S.Y., (1994).** Antimicrobial susceptibility patterns of bacterial isolates at the American University Medical Center in Lebanon. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **20**: 151-158.

**Asif M., Acharya1 M., Lakshmayya K., Singh A., (2013).** Bioactivity of 6-Aryl-4, 5-dihydropyridazin-3(2H)-ones Using Brine Shrimp (*Artemia salina*) Lethality Assay. *Inter J Pharma Chem*, **3(2)**: 40-44.

**Avril J-L., Dabernat H., Denis F., et Monteil H., (2000).** Bactériologie clinique. 3<sup>e</sup> édition. Ed : ellipse. Paris, France. Pp : 503- 507.

**Baba Ahmed-Kazi Tani Z., Decré D., Genel N., Boucherit-Otmani Z., Arlet G., Drissi M., (2013).** Molecular and Epidemiological Characterization of Enterobacterial Multidrug-Resistant Strains in Tlemcen Hospital (Algeria) (2008–2010). *Microb Drug Resist*, **00(0)**: 1-6.

**Baba Ahmed-Kazi Tani Z., Arlet G., (2014).** Actualité de la résistance aux antibiotiques chez les bacilles à Gram négatif en Algérie. *Pathol Biol*, **62**: 169-178.

**Badampudi S.K., Aluru R.G.P., Papammagari R.R., Lakshmana Rao Krishna Rao R., (2014).** Synthesis, characterization and pharmacological evaluation of certain sulfonamide containing heterocyclic motifs. *Polish annal Med*, **21**: 75- 81.

**Badisa R.B., Darling-Reed S.F., Joseph P., (2009).** Cooperwood, J.S.; Latinwo, L.M.; Goodman, C.B. Selective Cytotoxic Activities of Two Novel Synthetic Drugs on Human Breast Carcinoma MCF-7 Cells. *Antican Res*, **29**: 2993-2996.

**Barbosa T.M., Levy, S.B., (2000).** The impact of antibiotic use on resistance development and persistence. *Drug Resist Update*, **3(5)**: 303-311.

**Barnes W., Tuley E., Eisenstadt E., (1982).** Base-sequence analysis of HisC revertants of the hiG46 missense mutation in Salmonella typhimurium. *Environ Mutagen*, **4**: 297-301.

**Bartel L.L., (1976).** Sulfonamide Sensitivity of Brine Shrimp, *Artemia salina*, Naupliis, An Approach to Anion Transport Mechanism. Zoologie. Oregon State University. USA. Thèse de Master.

**Bass L., Liebert C.A., Lee M.D., (1999).** Incidence and characterization of integrons, genetic elements mediating multiple-drug resistance, in avian *Escherichia coli*. *Antimicrob Ag Chemoth*, **43(12)**: 2925-2929.

**Batah R., Loucif L., Olaitan A.O., Boutefnouchet N., Allag H., Rolain J-M., (2015).** Outbreak of *Serratia marcescens* Coproducing ArmA and CTX-M-15 Mediated High Levels of Resistance to Aminoglycoside and Extended-Spectrum Beta-Lactamases, Algeria. *Microb Drug Resis*, **21(4)**: 470-476.

**Bauer A.W., Kirby W.M., Sherris J.C., Turck M., (1966).** Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol*, **45(4)**: 493-496.

**Bayram A., Balci I., (2006).** Patterns of antimicrobial resistance in a surgical intensive care unit of a university hospital in Turkey. *BMC Infect Dis*, **6**: 155-159.

**Beaune P., Lemestre-Cornet R., Kremers P. et al., (1985).** The Salmonella/microsome mutagenicity test: comparison of human and rat livers as activating systems. *Mutat Res*, **156**: 139-146.

**Becheker I., Berredjem H., Boutefnouchet N., Berredjem M., Ladjama A., (2014).** Antibacterial activity of four sulfonamide derivatives against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Chem Pharma Res*, **6(11)**: 893-899.

**Bégin D., Lavoué J., Gérin M., (2002).** La substitution des Solvants par le diméthylsulfoxyde. Rapport : Bilans de connaissances. Département de santé environnementale et santé au travail. Faculté de médecine, Université de Montréal.

**Belbel Z., Chettibi H., Dekhil M., Ladjama A., Nedjai S., Rolain JM., (2014).** Outbreak of an armA Methyltransferase Producing ST39 Klebsiella pneumoniae Clone in a Pediatric Algerian Hospital. *Microb Drug Resist*, **20(4)**: 310-315.

**Berredjem H., Réggami Y., Benlaifa M., Brredjem M., Bouzerna N., (2015).** Antidiabetic and Hypolipidemic Potential of 3, 4-dihydroisoquinolin-2(1H)-Sulfonamide in Alloxan Induced Diabetic Rats. *International Journal of Pharmacology*, **11(3)**: 226-235.

**Berthelot-Ricou A., Perrin J., Orsière T., Aye M., Roustan A., Botta B., Courbiere B., (2013).** Risque génotoxique et ovocytes : principes de toxicologie génétique et applications. *Gynécol Obstétr Fertil*, **41**: 544-547.

**Bhan M.K., Bahl R., Sazawal S. et al., (2002).** Association between *Helicobacter pylori* infection and increased risk of typhoid fever. *J Infect Dis*, **186**: 1857-1860.

**Biémont C., (2008).** Dossier Evolution et Créationnisme : Les éléments transposables une force évolutive majeure. *Nat Scien Soc*, **16**: 41-43.

**Binet S., Rihin B., (2001).** L'exposition aux produits cancérigènes Aspects fondamentaux et pratiques. *Arch Malad Prof Envir*, **62(6)**: 501.

**Binet S., (2001).** Tests de génotoxicité. *Arch Malad Prof Envir*, **62(6)**: 501-505.

**Bissonnette L., Champetier S., Buisson JP., Roy PH., (1991).** Characterisation of the nonenzymatic Chloramphenicol resistance (cmIA) gene of the In4 integron of Tn1696: similarity of the product to transmembrane transport proteins. *J Bacteriol*, **173**: 493-502.

**Blahna M.T., Zalewski C.A., Reuer J., Kahlmeter G., Foxman B., Marrs C.F., (2006).** The role of horizontal gene transfer in the spread of trimethoprim-sulfamethoxazole resistance among uropathogenic *Escherichia coli* in Europe and Canada. *J Antimicrob Chemother*, **574**: 666-672.

**Bombardier M., Bermingham N., Legault R., Fouquet A., (2001).** Evaluation of an SOS-Chromotest-based approach for the isolation and detection of sediment-associated genotoxins. *Chemosphere*, **42**: 931-944.

**Bonnet R., (2004).** Growing Group of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases: the CTX-M Enzymes. *Antimicrob Agents hemothe*, **48(1)**: 1-14.

**Boufas W., Dupont N., Berredjem M., Berrezag K., Becheker I., Berredjem H., Aouf N-D., (2014).** Synthesis and antibacterial activity of sulfonamides. SAR and DFT studies. *J Molec Struct*, **1074**: 180-185.

**Borrell J.I., Teixido J., Martinez-Teipel B., Matallana J.L., Copete M.T., Llimargas A., (1998).** Synthesis and Biological Activity of 4-Amino-7-oxo-Substituted Analogues of 5-Deaza-5, 6, 7, 8-tetrahydrofolic Acid and 5,10-Dideaza-5,6,7,8-tetrahydrofolic Acid. *J Med Chem*, **41**: 3539-3545.

**Bosgiraud C., (2003).** Microbiologie générale et santé. Ed : ESKA, France. Pp : 303.

**Boulahbal F., (2006).** Microbiologie S1 Clinique. Ed : Office des Publications Universitaires., 5<sup>ème</sup> édition. Algérie, Pp: 127-303.

**Bounias M., (1983).** L'analyse biochimique quantitative par nanochromatographie en couche mince. Ed : Masson. France. Pp : 7-20.

**Bradford P.A., (2001).** Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev*, **14**: 933-951.

**Broschinski L., Madle S., Hensel C., (1998).** Genotoxicity tests for new chemicals in Germany: routine in vitro test systems. *Mut Res*, **418**: 121-129.

**Bryskier A., (1999).** Antibiotiques, Agents antibactériens et antifongiques. Ed : Ellipse, France. Pp: 86-998.

**Caldwell G.S., Bentley M.G., Olive P.J.W., (2003).** The use of a brine shrimp (*Artemia salina*) bioassay to assess the toxicity of diatom extracts and short chain aldehydes. *Toxicon*, **42**: 301-306.

**Carpenter C.F., Chambers H.F., (2004).** Daptomycin: another novel agent for treating infections due to drug-resistant gram-positive pathogens. *Clin Infect Dis*, **38(7)**: 994-1000.

**Castellazzi M., George J., Buttin G., (1972).** Prophage induction and cell division in *E. coli*. *Molec Gen Genet*, **119(2)**: 153-174.

**Cattoir V., Daurel C., ( 2010).** Quelles nouveautés en antibiothérapie ? *Méd Mal Infect*, **40**: 135-154.

**Cavallo J.D., Meyran M., (1992).** Les salmonelles et leur pathologie : base bacteriologique du traitement. *Med Mal Infect*, **22**: 331-339.

**Chohan Z.H., UL-Hassan M., Khan K.M., Supuran C.T., (2005).** In-vitro antibacterial, antifungal and cytotoxic properties of sulfonamide—derived Schiff's bases and their metal complexes. *J Enzy Inhib Med Chem*, **20(2)**: 183-188.

**Chohan Z.H., Supuran C.T., (2008).** Structure and biological properties of first row d-transition metal complexes with N-substituted sulfonamides. *J Enzy Inhib Med Chem*, **23(2)**: 240-251.

**Chohan Z.H., (2009).** Metal-based antibacterial and antifungal sulfonamides: synthesis, characterization, and biological properties. *Transition Met Chem*, **34**:153-161.

**Chohan Z.H., Sumrra S.H., Youssoufi M.H., Hadda T.B., (2010).** Metal based biologically active compounds: Design, synthesis, and antibacterial/antifungal/cytotoxic properties of triazole-derived Schiff bases and their oxovanadium(IV) complexes. *Eur J Med Chem*, **45**: 2739-2747.

**Chohan Z.H., Shad H.A., (2012).** Metal-based new sulfonamides: Design, synthesis, antibacterial, antifungal, and cytotoxic properties. *J Enzy Inhib Med Chem*, **27(3)**: 403-412.

**Claverie I., Hedde H., (2008).** Pharmacologie générale, Toxicologie, mécanismes fondamentaux. 2<sup>e</sup> édition. Ed: Porphyre. France. Pp : 47-50.

**Cleuvers M., (2003).** Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicol Lett*, **142**:185-194.

**Clinical and Laboratory Standards Institute (2010).** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 19th informational supplement. CLSI document M100-S19. Wayne PA: CLSI.

**Coates A., Hu Y., Bax R., Page C., (2002).** The future challenges facing the development of new antimicrobial drugs. *Nat Rev Drug Discov*, **1(11)**: 895-910.

**Commission of the European Communities (1991).** Council Directive of 15 July 1991, concerning the placing of plant protection products on the market, consolidated text. Office for official publications of the European communities, Luxembourg, LU.

**Dancer S.J., Shears P., Platt D.J., (1997).** Isolation & characterization of coliforms from glacial ice and water in Canada's High Arctic. *J Appl Microbiol*, **82(5)**: 597- 609.

**Davies J.E., (1997).** Origins, acquisition and dissemination of antibiotic resistance determinants. In Antibiotic Resistance: Origins, Evolution, Selection and Spread. Ed: Chadwick, D.J., Goode, J. (Eds.), John Wiley & Sons Ltd. Chichester, UK. Pp: 5-35.

**Dearfield K.L., Moore M.M., (2005).** Use of genetic toxicology information for risk assessment. *Environ Mol Mutagen*, **46**: 236-245.

**de Kraker M.E., Davey P.G., Grundmann H., (2011).** Mortality and hospital stay associated with resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bacteremia: estimating the burden of antibiotic resistance in Europe. *PloS Med*, **8(10)**: 1001-1104.

**Djahmi N., Messad N., Nedjai S., Moussaoui A., Mazouz D., Richard J. L., Sotto A., Lavigne J. P., (2013).** Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* strains isolated from inpatients with infected diabetic foot ulcers in an Algerian University Hospital. *Clin Microbiol Infect*, **19**: 398-404.



**De Meo M., Vanelle P., Bernadini B., Laget M., Maldonado J., Jentzer O., Crozet M.P., Dumenil G., (1992).** Evaluation of the Mutagenic and Genotoxic Activities of 48 Nitroimidazoles and Related Imidazole Derivatives by the Ames Test and the SOS Chromotest. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **19**: 167-181.

**de Perio M.A., Yarnold P.R., Warren J., et al., (2006).** Risk factors and outcomes associated with non-Enterococcus faecalis, non-Enterococcus faecium enterococcal bacteremia. *Infect Control Hosp Epidemiol*, **27(1)**: 28-33.

**Desnottes J-F., (1999).** Nouvelles molécules et nouvelles cibles en antibiothérapie. *Antibiotiques*, **1**: 201-209.

**Devoret R., (1992).** Les fonctions SOS ou comment les bactéries survivent aux lésions de leur ADN. *Ann Inst Pasteur (Actual)*, **1**: 11-20.

**Dogruer.S., Urlu S., Onkol T., Ozcelik B., Sahin M.F., (2010).** Synthesis of some pyridazine derivatives carrying urea, thiourea, and sulfonamide moieties and their antimicrobial activity. *Turk J Chem*, **34**: 57-65.

**Domagk G., (1935).** Chemotherapie der bakteriellen Infektionen. *Angewandte Chemie*, **48(42)**: 657-667.

**Doublet B., (2004).** Caractérisation des éléments génétiques mobiles du gène de résistance au florfenicol floR chez *Salmonella enterica* et *Escherichia coli*. Tours, Thèse de Doctorat.

**Dumitrascu M., (2011).** *Artemia salina*. *Balneo-Res J*, **2(4)**: 119-122.

**EEC, Directive 67/548/** EEC on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions relating to the classification, packaging and labelling of dangerous substances, *Official Journal of the European Communities*. No.196-1967. 1-98.

**Elazhari M., Saile R., Dersi N., Timinouni M., Elmalki A., Bouhali Zriouil S., Hassar M., Zerouali K., (2009).** Activité de 16 antibiotiques vis-à-vis des Staphylococcus aureus communautaires à Casablanca (Maroc) et Prévalence des Souches Résistantes à la Métricilline. *Europ J Sci Res*, **30**: 128-137.

**Elhamzaoui S., Benouda A., Allali F., Abouqual R., Elouennass M., (2009).** Sensibilité aux antibiotiques des souches de *Staphylococcus aureus* isolées dans deux hôpitaux universitaires à Rabat, Maroc. *Médecine et maladies infectieuses*, **39(12)**: 891-895.

**El-Sayed N.S., El-Bendary E.R., El-Ashry S.M., El-Kerdawy M.M., (2011).** Synthesis and antitumor activity of new sulfonamide derivatives of thiadiazolo [3, 2-a]pyrimidines. *European J Med Chem*, **46**: 3714-3720.

**Everest P., Wain J., Roberts M., Rook G., Dougan G., (2001).** The molecular mechanisms of severe typhoid fever. *Trends Microbiol*, **9**: 316- 320.

**Fabre R., Mérens A., Lefebvre F., Epifanoff G., Cerutti F., Pupin H., Tardif D., Cavallo J-D., Ternois I., (2010).** Sensibilité aux antibiotiques des *Escherichia coli* isolés d'infections urinaires communautaires. *Méd malad infect*, **40**: 555-559.

**Fauchère J.L., Avril J.L., (2002).** Bactériologie générale et médicale. Ed Ellipses. France. Pp: 252-253.

**Favilla M., Macchia L., Gallo A., Altomare C., (2006).** Toxicity assessment of metabolites of fungal biocontrol agents using two different (*Artemia salina* and *Daphnia magna*) invertebrate bioassays. *Food Chem. Toxicol*, **44**:1922-1931.

**Flamand N., Meunier JR., Meunier PA., Agapakis-Caussé C., (2001).** Mini mutagenicity test: a miniaturized version of the Ames test used in the prescreening assay for point mutagenesis assessment. *Toxicol in vitro*, **15**: 105-114.

**Fraimow H.S., Jungkind D.L., Lander D.W., Delso D.R., Dean J.L., (1994).** Urinary Tract Infection with an *Enterococcus faecalis* Isolate that Requires Vancomycin for Growth. *Ann Intern Med*, **121(1)**: 22-26.

**Frenay J., (2006).** Entérobactéries. EMC: *Biol clin*, **9(5)**: 135.

**Frenod E., (2006).** Existence result for a model of *Proteus mirabilis* swarm. *Differ Interg Equat*, **19(16)**: 697-720.

**Frost L.S., Leplae R., Summers A.O., Toussaint,A., (2005).** Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nature Rev Microbiol*, **3(9)**: 722-732.

**Furuya E.Y., Lowy F.D., (2006).** Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. *Microbiol*, **4(1)**: 36-45.

**Genç Y., Özkanca R., Bekdemir Y., (2008).** Antimicrobial activity of some sulfonamide derivatives on clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *An Clin Microbiol Antimicrob*, **7**: 17-22.

**Geran R.I., Greenberg H.M., McDonald M., Abbott B.J., (1972).** Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems. *Cancer Chemoth Rep*, **33**: 1-17.

**González-Álvarez M., Pascual-Álvarez A., Agudo L.d.C., Castiñeiras A., Liu-González M., Borrása J. and Alzuet-Piña G., (2013).** Mixed-ligand copper(II)–sulfonamide complexes: effect of the sulfonamide derivative on DNA binding, DNA cleavage, genotoxicity and anticancer activity. *Dalton Transactions*, **28(42)**: 10244-10259.

**Grare M., Fontanay S., Massimba Dibama H., Mourer M., Regnouf-de-Vains J-B., Finance C., Duval R.E. (2010).** Cinétique d'action du para-guanidinoéthylcalix [4] arène, et évolution de la perméabilité membranaire. *Pathol Biol*, **58**: 46-51.

**Hakura A., Shimada H., Nakajima M., et al., (2005).** Salmonella/human S9 mutagenicity test: a collaborative study with 58 compounds. *Mutagenesis*. **20**: 217-228.

**Hall R.M., Collis C.M., Kim M.J., Partridge S.R., Recchia G.D., Stokes H.W., (1999).** Mobile gene cassettes and integrons in evolution. *Annals NY Acad Sci*, **870**: 68-80.

**Hallet B., Sherratt D., (1997).** Transposition and site-specific recombinaison: adapting DNA cut-and-paste mechanisms to a variety of genetic rearrangements. *FEME Microbiol Rev*, **21**: 157-178.

**Harbottle H., Thakur S., Zhao S., White DG., (2006).** Genetics of antimicrobial resistance. *Anim Biotechnol*, **17(2)**: 111-124.

**Hardy S.P., (2002).** , Human Microbiology. Edition: Taylor et Francis. published in the USA and Canada. Pp : 25.

**Hart T., Shears P., (1997).** Atlas de poche de microbiologie. Ed : Medecine-Science, Flammarion. Pp : 71.

**Hassanzadeh P., Motamedifar M., Hadi N., (2009).** Prevalent bacterial infections in intensive care units of Shiraz University of medical sciences teaching hospitals, Shiraz, Iran. *Jpn J Infect Dis*, **62**: 249-253.

**Hayatsu H., (1990).** Chapter 1: Blue Cotton - Broad Possibility in Assessing mutagens/Carcinogens in the Environment. In *Advances in Mutagenesis Research 1*. Edited by G. Obe. Ed: Springer-Verlag. Berlin Heidelberg. Pp : 1-2.

**He L., Orr G.A., Horwitz S.B., (2001).** Novel molecules that interact with microtubules and have functional activity similar to Taxol™. *Drug Discovery Today*, **6(22)**: 1153-1164.

**Henriet L., Guillemot D., (2000).** Pharmaco-épidémiologie des résistances, consommation des antibiotiques. *Med Malad Infect*, **30**: 160-163.

**Hessainia S., Bouchareb F., Cheloufi H., Berredjem M., Berredjem H., Becheker I., and Aouf N-D., (2013).** Efficient synthesis and antibacterial activity of novel cyclic sulfamides. *RASAYAN J Chem*, **6(3)**: 175-182.

**Hisem D., Hrouzek P., Tomek P., Tomšicková J., Zapomelová E., Skácelová K., Lukešová A. and Kopecký J., (2011).** Cyanobacterial cytotoxicity versus toxicity to brine shrimp *Artemia salina*. *Toxicon*, **57**: 76-83.

**Hodgson E., Smart R.C., (2001).** Introduction to Biochemical Toxicology, 3rd ed. Ed: Wiley. New York. Pp : 23-25.

**Hodgson E., (2004).** Chapter 1 : Introduction to Toxicology. In *Textbook of modern toxicology*. 3<sup>rd</sup> edition. Edited by Ernest Hodgson. Ed: WILEY- INTERSCIENCE. North Carolina State, USA. Pp : 3-10.

**Hojabri Z., Ahangarzadeh Reza M., Nahaei M.R., Soroush M.H., Ghojzadeh M., Pirzadeh T., Davodi M., Ghazi M., Bigverdi R., Pajand O., Aghazadeh M., (2013).** Comparison of *in Vitro* Activity of Doripenem versus Old Carbapenems against *Pseudomonas Aeruginosa* Clinical Isolates from both CF and Burn Patients. *Advan Pharma Bull*, **3(1)**: 121-125.

**House D., Wain J., Ho VA., et al., (2001).** The serology of typhoid fever in an endemic area and its relevance to diagnosis. *J Clin Microbiol*, **39**: 1002-1007.

**Hughes D., Andersson D.I., (2001).** Antibiotic Development and Resistance. Ed: TAYLOR ET FRANCIS. London and New York. Pp: 38.

**Ishfaq H., Farrukh H., Zaman S., Naffes B. and Abid A.K., (2013).** Cytotoxicity and phytotoxicity of some selected medical plants of family Solanaceae. *Pak J Bot*, **45(5)**: 1749-1754.

**Isono K., Yourno J., (1974).** Chemical carcinogens as frameshift mutagens: Salmonella DNA sequence sensitive to mutagenesis by polycyclic carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **71**: 1612-1617.

**Jain P., Saravanan C., Kumar Singh S., (2013).** Sulphonamides: Deserving class as MMP inhibitors. *Europ J Med Chem*, **60**: 89-100.

**Janion C., (2008).** Inducible SOS Response System of DNA Repair and Mutagenesis in Escherichia coli. *Int J Biol Sci*, **4(6)**: 338-344.

**Janson M.A., A (2009).** Genotoxic impurity analysis in pharmaceuticals. December 2009. UMI 1473496 Copyright 2010 by ProQuest LLC. Faculty of the Graduate School University of southern California. These de doctorat.

**Julie L., Badger Monique F., Stins K., Sik K., (1985).** Citrobacter freundii Invades and Replicates in Human Brain Microvascular Endothelial Cells. *Hinyokika kiyo. Acta Urologica Japonica*, **31(7)**: 1159-1170.

**Kamath S., Mallaya S., Shenoy S., (2010).** Nosocomial infections in neonatal intensive care units: profile, risk factor assessment and antibiogram. *Indian J Pediatr*, **77**: 37-39.

**Kamba A.S., Hassan L.G., (2010).** Antibacterial Screening and Brine Shrimp (*Artemia salina*) Toxicity of *Securidaca longepedunculata* (Polygalaceae) Root Bark. *AJPSP*, **1(1)**: 85-95.

**Keller R., Pedroso M.Z., Ritchmann R., and Silva R.M., (1998).** Occurrence of Virulence-Associated Properties in *Enterobacter cloacae*. *Infect Immun*, **66(2)**: 645-649.

**Khennouchi N.C.H., Loucif L., Boutefnouchet N., Alleg H., Rolain J.M., (2015).** MALDI-TOF MS as a tool to detect a nosocomial outbreak of extended-spectrum beta lactamase- and *armA* methyltransferase-producing *Enterobacter cloacae* clinical isolates, Algeria. *Antimicrob Agents Chemother*, **59(10)**: 6477-6483.

**Kirkland D., Aardema M., Henderson L., (2005).** Evaluation of the ability of a battery of three in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens. Sensitivity, specificity and relative predictivity. *Mutat Res*, **608**: 29-42.

**Klibi N., Ben Slama K., Sáenz Y., et al., (2007).** Detection of virulence factors in high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates from a Tunisian hospital. *Can J Microbiol*, **53(3)**: 372-379.

**Kosek M., Bern C., Guerrant R.L., (2003).** The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000 . *Bull World Health Organ*, **81**: 197-204.

**Ku W.W., Bigger A., Brambilla G., Glatt H., Gocke E., Guzzie P.J., Hakura A., Honma M., Martus H-J., Obachi R.S., Roberts S., (2007).** Strategy for genotoxicity testing-Metabolic considerations. *Mutat Res*, **627**: 59-77.

**Kumar M., Narasimhan B., Ramasamy K., Mani V., Mishra RK., Majeed A.B.A., (2013).** Synthesis, antimicrobial and cytotoxic evaluation of 4-(1-aryl-5-halo-2-oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylideneamino)-N-substituted benzene sulphonamides. *Arab J Chemj arab*, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.11.009>.

**Labid A., Gacemi-Kirane D., Timinouni M., Amoura K., Rolain J-M., (2014).** High prevalence of extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producers in fatal cases of pediatric septicemia among the Enterobacteriaceae in the pediatric hospital of Annaba, Algeria. *African Journal of Microbiology Research*, **8(9)**: 947-954.

**Langevin R., Rasmussen J. B., Slotterduk H., Blaise C. (1992).** Genotoxicity in water and sediment extracts from the St Lawrence river system, using the SOS Chromotest. *Wat Res*, **26(4)**: 419-429.

**Latha L.Y., Sasidharan S., Zuraini Z., Suryani S., Shirley L., Sangetha S., Davaselvi M., (2007).** Antimicrobial activities and toxicity of crude extract of the *Psophocarpus tetranonolobus* pods. *Afr J Trad CAM*, **4(1)**: 59-63.

**Leclercq R., (2002).** Les coques à Gram-positif multirésistants aux antibiotiques : intérêt du linézolide. *Med malad infect*, **32**: 449-459.

**Leopold G., Koss MD., (2005).** Book review Gerhard Domagk, the first man to triumph over infectious diseases. *Hum Pathol*, **36**: 1238- 1239.

**Levine S.G., (1990).** Identification of Unknowns by Melting Point and Thin-Layer Chromatography in Combination. *J Chem*, **67**: 972-975.

**Li J., Kong X., Li X., Yang Y., Zhang J., (2013).** Genotoxic evaluation of aspirin eugenol ester using the Ames test and the mouse bone marrow micronucleus assay. *Food Chem Toxicol*, **62**: 805-809.

**Lockhart S.R., Abramson M.A., Beekmann S.E., et al., (2007).** Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli causing infections in intensive care unit patients in the United States between 1993 and 2004. *J Clin Microbiol*, **45(10)**: 3352-3359.

**Lolo M., Pedreira S., Miranda J.M., Vazquez B.I., Franco C.M., Cepeda A., Fente C., (2006).** Effect of cooking on enrofloxacin residues in chicken tissue. *Food Addit Contam*, **23**: 988-993.

**Loudon I., (2000).** The Tragedy of Childbed Fever. Oxford: Oxford University Press.

**Loudon I., (2008).** The use of historical controls and concurrent controls to assess the effects of sulphonamides. *J R Soc Med*, **101**: 148-155.

**Luxmini K.P.A.M.K., Dharmadasa R.M., Samarasinghe K., Muthukumarana P.R.M., (2015).** Comparative Pharmacognostic Study of Different Parts of *Withania somnifera* and its Substitute *Ruellia tuberosa*. *World J Agricul Res*, **3(1)**: 28-33.

**Mahamat A., Lavigne J.-P., Bouziges N., Daurès J.-P., Sotto A., (2006).** Profils de résistance des souches urinaires de *Proteus mirabilis* de 1999 à 2005 au CHU de Nîmes. *Pathol Biol*, **54**: 456-461.

**Mahlen S.D., (2011).** Serratia Infections: from Military Experiments to Current Practice. *Clin Microbiol Rev*, **24(4)**: 755-791.

**Mainardi J.L., Shlaes D.M., Goering R.V., et al., (1995).** Decreased teicoplanine susceptibility of methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis*, **171**: 1646-1650.

**Mainardi J.L., Fourgeaud M., Hugonnet J.E., Dubost L., Brouard J.P., Ouazzani J., et al., (2005).** A novel peptidoglycan cross-linking enzyme for a beta-lactam-resistant transpeptidation pathway. *J Biol Chem*, **280(46)**: 38146-38152.

**Mandell G., Bennett J. and Dolin R., (2009).** Enterobacteriaceae, Principles and Practice of Infectious Diseases. 7th ed. Churchill Livingstone, An Imprint of Elsevier. Pp: 56.

**Manilal A., Sujith S., Kiran G.S., Selvin J., Shakir C., (2009).** Cytotoxic potentials of red alga, *Laurencia brandenii* collected from the Indian coast. *Global J Pharm*, **3**: 90-94.

**Marco Sánchez F., Turabian Fernández J.L., Durán Pérez-Navarro A., (1985).** Fatal Citrobacter Freundii Bronchopneumonia Acquired in the Community in an Uncompromised Patient. *Revis Clín Españ*, **176(6)**: 320.

**Maron D., Ames B.N., (1983).** Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res*, **113**: 173-215.

**Massah AR., Adibi H., Khodarahmi R., Abiri R., Majnooni MB., Shahidi S., Asadi B., Mehrabi M., Zolfigol MA., (2008).** Synthesis, in vitro antibacterial and carbonic anhydrase II inhibitory activities of N-acylsulfonamides using silica sulfuric acid as an efficient catalyst under both solvent-free and heterogeneous conditions. *Bioorg Med Chem*, **16**: 5465-5472.

**McDermott P.F., Walker R.D., White D.G., (2003).** Antimicrobials: modes of action and mechanisms of resistance. *Int J Toxicol*, **22 (2)**: 135-143.

**McManus M.C., (1997).** Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *Am J Health-Syst PH*, **54 (12)**: 1420-1433.

**Melagraki G., Afantitis A., Sarimveis H., Igglessi-Markopoulou O., Supuran CT., (2006).** QSAR study on para-substituted aromatic sulfonamides as carbonic anhydrase II inhibitors using topological information indices. *Bioorg Med Chem*, **4**: 1108-1114.



**Meradji S., Barguigua A., Zerouali K., Mazouz D., Chettibi H., Elmdaghri N. et Timinouni M., (2015).** Epidemiology of carbapenem non-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Eastern Algeria. *Antimicrobial Resist Infect Contr*, **4**: 27-34.

**Meyer B.N., Ferrigni N.R., Putnam J.E., Jacobsen L.B., Nichols D.E., McLaughlin J.L., (1982).** Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*, **45**: 31-34.

**Michael A.S., Thompson C.G., Abramovitz M., (1956).** *Artemia salina* as a test organism for bioassay. *Science*, **123**: 464.

**Mortelmans K., Zeiger E., (2000).** The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutat Res*, **455**: 29-60.

**Musgrove C., Camps M., (2012).** Chapter 3: Models for Detection of gnototoxicity *in vivo*: Present and Future. In Biochemistry, Genetics and Molecular Biology » "Mutagenesis". Edited by Rajnikant Mishra. Croatia. Pp: 32.

**Nam S-H., Kim S.W., An Y.J., (2012).** No evidence of the genotoxic potential of gold, silver, zinc oxide and titanium dioxide nanoparticles in the SOS chromotest. *J Appl Toxicol*, **33**: 1061-1069.

**Nauciel C., Vildé JL., (2005).** Bcatériologie médicale. Ed. Masson. France. Pp : 20-122.

**Nedjai S., Barguigua A., Djahmi N., Jamali L., Zerouali K., Dekhil M., Timinouni M., (2012).** Prevalence and characterization of extended spectrum  $\beta$ -lactamases in *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* group bacteria, in Algeria. *Med Mal Infect*, **42**: 20-29.

**Nedjai S., Barguigua A., Djahmi N., Jamali L., Zerouali K., Dekhil M., Timinouni M., (2013).** Prevalence and characterization of extended spectrum beta-lactamase producing *Enterobacter cloacae* strains in Algeria. *J Infect Dev Ctries*, **15**: 804-811.

**Nordmann P., Cuzon G., Naas T., (2009).** The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis*, **9(4)**: 228-236.

**Oliphant C. M., Eroschenko K., (2015).** Antibiotic Resistance, Part 1: Gram-positive Pathogens. *J Nurse Practi*, **11(1)**: 70-78.

**Otang W.M., Grierson D. S. and Ndip R.N., (2013).** Assessment of potential toxicity of three South African medicinal plants using the brine shrimp (*Artemia salina*) assay. *Afric J Pharmacy Pharm*, **7(20)**: 1272-1279.

**Ozbek N., Katircioglu H., Karacan N. and Baykal T., (2007).** Synthesis, characterization and antimicrobial activity of new aliphatic sulfonamide. *Bioorg Med Chem*, **15**: 5105-5109.

**Ozbek N., Alyar S., Mamas S., Sahin E., Karacan N., (2012).** Synthesis, crystal structure, antibacterial activities, and electrochemical studies of new N,N0-polymethylene bis-sulfonamides. *J Molec Struc*, **1010**: 1-7.

**Ozdemir U.O., Guvenc P., Sahin E., Hamurcu F., (2009).** Synthesis, characterization and antibacterial activity of new sulfonamide derivatives and their nickel (II), cobalt (II) complexes. *Inorg Chim Acta*, **362**: 2613-2618.

**Palumbi SR., (2001).** Humans as the world's greatest evolutionary force. *Science*, **293(5536)**: 1786-1790.

**Papich M.G., Riviere J.E. (2009).** Fluoroquinolone antibacterial drugs. In *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 9<sup>e</sup> edition. Ed: Wiley-Blackwell. Iowa State University Press, USA. Pp: 983-1011.

**Park Talaro K., (2008).** FOUNDATIONS IN MICROBIOLOGY: BASIC PRINCIPLES. 7<sup>th</sup> edition. Ed: McGraw-Hill. New York. Pp: 277-386.

**Parry C.M., (2006).** Chapter 1: Epidemiological and clinical aspects of human typhoid fever. In *Salmonella infections; Clinical, Immunological and Molecular Aspects*. Edited by Mastroeni P. and Maskell D. Ed: Cambridge University Press . United Kingdom, Pp: 1-7.

**Paterson D.L., (2006).** Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. *Am J Infect Control*, **34**: 20-28.

**Patrick G.L., (2003).** Chimie pharmaceutique. 2<sup>e</sup> edition. Ed : de boeck. Paris. Pp : 21-386.

**Phillips I., Casewell M., Cox T., (2004).** Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *J Antimicrob Chemoth*, **53(1)**: 28-52.

- Philippon A., Arlet G., (2006).** Beta-lactamases of Gram negative bacteria: never-ending clockwork. *Ann Biol Clin*, **64**: 37-51.
- Pillière F., (2001).** Salariés exposés à des génotoxiques, Place de la surveillance biologique et des tests de mutagenèse. *Arch malad profes envir*, **62(6)**: 505-507.
- Pimenta L.P.S., Pinto G.B., Takahashi J.A., Silva L.G.F., Boaventura M.A.D., (2003).** Biological screening of Annonaceous Brazilian Medicinal Plants using *Artemia salina* (Brine shrimp Test). *Phytomedicine*, **10**: 209-212.
- Ponka D., (2006).** Approach to managing patients with sulfa allergy; Use of antibiotic and nonantibiotic sulfonamides. *Can Fam Physician*, **52**: 1434-1438.
- Poole K., (2000).** Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in Grampositive bacteria and the mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother*, **44**: 2595-2599.
- Pillco A., (2011).** Evaluación toxicológica de mezclas complejas mediante ensayos alternativas a la experimentación animal de genotoxicidad, mutagenicidad y ecotoxicidad (Toxicological evaluation of complex mixtures employing genotoxicity, mutagenicity and ecotoxicity assays as an alternative to animal testing). Thèse de Doctorat. Université de Madrid, Espagne. Pp: 173.
- Pillco A., de la Peña E., (2014).** Chapter 1: Ames Test (Bacterial Reverse Mutation Test): Why, When, and How to Use. In *Genotoxicity and DNA Repair, A Practical Approach*. Edited by Sierra L.M. Ed: Humana press. Oviedo, Spain. Pp: 3-18.
- Quillardet P., Huisman O., D'Ari R., Hofnung M., (1982).** SOS chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in *Escherichia coli* K12 to measure genotoxicity. *Proc Na. Acad Sci USA*, **79**: 5971-5975.
- Quillardet P., Hofnung M., (1985).** The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assays for genotoxins; procedures. *Mutat Res*, **147**: 65-78.
- Quillardet P. and Hofnung M., (1993).** The SOS chromotest: a review. *Mutat Res*, **297**: 235-279.
- Rahal K. et al., (2005).** Standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle nationale selon les recommandations de l'OMS 2005. Pp : 4-40.

**Ramoul A., Hammani S., Dekhil M., Aimiri A., Boutiba-Ben Boubaker I., (2013).** Phenotypic and genotypic characterization of clinical multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* from Algerien intensive care units. *Afric J Microbiol Res*, **7(10)**: 874-888.

**Reddy B.U., (2009).** cytotoxicity assay of ethanolic extracts of amalakyadi churna and its ingredients using *artemia salina*. *Pharmacologyonline*, **3**: 591-596.

**Référentiel en microbiologie médicale (REMIC), 4<sup>e</sup> édition 2010.** Par le groupe Rémic de la Société Française de Microbiologie SFM. Edition et communication.

**Rice L.B., (2001).** Emergence of vancomycin-resistant enterococci. *Emerg Infect Dis*, **7**: 183-187.

**Ronald A., (2002).** The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens. *Am J Med*, **113**: 14-19.

**Rossi F., Baquero F., Hsueh P.R., et al., (2006).** *In vitro* susceptibilities of aerobic and facultatively anaerobic Gram-negative bacilli isolated from patients with intra-abdominal infections worldwide: 2004 results from SMART (Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends). *J Antimicrob Chemother*, **58(1)**: 205-210.

**Rossolini G.M., Mantengoli E., Docquier J.D., Musmanno R.A., Coratza G., (2007).** Epidemiology of infections caused by multiresistant gram-negatives: ESBLs, MBLs, panresistant strains. *New Microbiol*, **30**: 332-339.

**Russo T.A., Johnson J.R., (2003).** Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli* : Focus on an increasingly important endemic problem . *Microbes Infect*, **5**: 449-456.

**Saga T., Yamaguchi K., (2009).** History of Antimicrobial Agents and Resistant Bacteria. *JMAJ*, **52(2)**: 103-108.

**Savageau M.A., (1983).** *Escherichia coli* habitats, cell types, and molecular mechanisms of gene control. *Am Nat*, **122**: 732-744.

**Schwaber M.J., Carmeli Y., (2007).** Mortality and delay in effective therapy associated with extended-spectrum beta-lactamase production in *Enterobacteriaceae* bacteraemia: a systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother*, **60**: 913-920.

**Sébastien F., (2009).** Les sulfamides antibactériens. *Actual pharmac*, **481**: 45- 48.

**Skett P., (2007).** Low-level Measurement of Potent Toxins. In *Analysis of Drug Impurities*, GlaxoSmithKline Research and Development. Editors: Richard J. Smith, Michael L. Ed: Blackwell Publishing. UK. Pp: 82-123.

**Sköld O., (1976).** R-Factor-Mediated Resistance to Sulfonamides by a Plasmid-Borne, Drug-Resistant Dihydropteroate Synthase. *Antimicrob agents chemothe*, **9**: 49-64.

**Sköld O., (2001).** Resistance to trimethoprim and sulfonamides. *Vet Res*, **32**: 261- 273.

**Sköld O., (2003).** Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. *Drug Resist Updates*, **3**: 155-160.

**Salyers A.A., Amabile-Cuevas C.F., (1997).** Why are antibiotic resistance genes so resistant to elimination? *Antimicrob Ag Chemoth*, **41(11)**: 2321-2325.

**Silva C.R., Borges F.F.V., Bernardes A., Perez C.N., de Melo e Silva D., Chen-Chen L., (2015).** Genotoxic, Cytotoxic, antigenotoxic, and Anticytotoxic Effects of Sulfonamide Chalcone Using the Ames Test and the Mouse Bone Marrow Micronucleus Test. *PLOS one*, **10(9)**: e0137063.

**Smith J.A., Henry D., Ngui-Yen J., Castell A., Coderre S., (1986).** Comparison of Agar Dilution, Microdilution, and Disk Elution Methods for Measuring the Synergy of Cefotaxime and Its Metabolite against Anaerobes. *J Clin Microbiol*, **23(6)**: 1104-1108.

**Stokes H.W., Hall R.M., (1989).** A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol Microbiol*, **3(16)**: 69-83.

**Strickertsson J.A.B., Desler C., Martin-Bertelsen T., Dantas Machado A.M., Wadstrom T., Winther O., Rasmussen L.J., Friis-Hansen L., (2013).** Enterococcus faecalis Infection Causes Inflammation, Intracellular Oxphos-Independent ROS Production, and DNA Damage in Human Gastric Cancer Cells. *PLOS one*, **8(4)**: 1-13.

**Suresha G.P., Suhas R., Kapfo W., Channe Gowda D., (2011).** Urea/thiourea derivatives of quinazolinone-lysine conjugates: Synthesis and structure-activity relationships of a new series of antimicrobials. *Europ J Med Chem*, **46**: 2530-2540.

**Sugimura T., (1985).** Carcinogenicity of mutagenic heterocyclic amines formed during the cooking process. *Mutat Res*, **150**: 33-41.

**Syahmi A.R.M., Vijayarathna S., Sasidharan S., Latha, L.Y., Kwan Y.P., Lau Y.L., Shin L.N., Chen Y., (2010).** Acute oral toxicity and brine shrimp lethality of *Elaeis guineensis* jacq., (oil palm leaf) methanol extract. *Molecules*, **15**: 8111-8121.

**Taubes G., (2008).** The bacteria fight back. *Science*, **321**: 356-361.

**Tagajdid M.R., Boumhil L., Iken M., Adnaoui M., Benouda A., (2010).** Étude de la résistance des souches d'*Escherichia coli* isolées dans les urines aux fluoroquinolones et aux céphalosporines de troisième génération. *Méd malad infect*, **40**: 70-73.

**Teichmann A., de Cunha Agra H.N., de Souza Nunes L., Pereira da Rocha M., Pollo Renner J.D., Gonçalves Possuelo L., Carneiro M., Rieger A., Brittes Benitez L., de Moura Valim A.R., (2014).** Antibiotic resistance and detection of the *sul2* gene in urinary isolates of *Escherichia coli* in patients from Brazil. *J Infect Dev Ctries*, **8(1)**: 39-43.

**Tennant R.W., Margolin B.H., Shelby M.D., Zeiger E., Haseman J.K., Spalding J., Caspary W., Resnick M., Stasiewicz S., Anderson B., et al., (1987).** Prediction of chemical carcinogenicity in rodents from in vitro genetic toxicity assays. *Science*, **236**: 933-941.

**Tenover F.C., (2006).** Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J Med*, **119**: 62-70.

**Thybaud V., Aardema M., Clements J., Dearfield K., Galloway S., Hayashi M., et al., (2007).** Strategy for genotoxicity testing: hazard identification and risk assessment in relation to in vitro testing. *Mutat Res*, **627**: 41-58.

**Timbrell, J. A., (2000).** Principles of Biochemical Toxicology. 3rd ed. Ed: Taylor and Francis. London. Pp: 13-14.

**Tommasino J-B., Renaud F.N.R., Luneau D., Pilet G., (2011).** Multi-biofunctional complexes combining antiseptic copper(II) with antibiotic sulfonamide ligands: Structural, redox and antibacterial study. *Polyhedron*, **30**: 1663-1670.

**Touati M., Diene S.M., Racherache A., Dekhil M., Djahoudi A., Rolain J.M., (2012).** Emergence of blaOXA-23 and blaOXA-58 carbapenemase-encoding genes in multidrugresistant *Acinetobacter baumannii* isolates from University Hospital of Annaba, Algeria. *Intern J Antimicrobial Agents*, **40(1)**: 89-91.

**Trémolières F., Bernard L., Cavallo J-D., Sollet J-P., (2005).** Faut-il développer de nouveaux antibiotiques ?. *Med Malad Infect*, **35**: 79-86.

**United States Environment Protection Agency (2002).** Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to fresh water and marine organisms, EPA/821/R-02-012.

**Veyssier R., (1995).** Maladies infectieuses communautaires. *Med Mal Infect*, **25**: 30-35.

**Walker G.C., (1984).** Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev*, **48**: 60-93.

**Wax R.G., Lewis K., Salyers A. A., Taber H., (2008).** Bacterial Resistance to Antimicrobials. 2<sup>nd</sup> edition. Ed: Taylor & Francis Group. USA. Pp: 255-256.

**Whalen J.G., Mully T.W., (2007).** Spontaneous *Citrobacter freundii* infection in an immunocompetent patient. *Arch dermatol*, **143(1)**: 124-135.

**White D.G., McDermott P.F., (2001).** Emergence and Transfer of Antibacterial Resistance. *J Dairy Sci*, **84**: 151-155.

**Wilson M., (2008).** BACTERIOLOGY OF HUMAINS : AN ECOLOGICAL PERSPECTIVE. Ed: Blackwell Publishing Ltd. USA. Pp: 71-136.

**Yala D., Merad AS., Mohamedi D., Ouarkorich MN., (2001).** Résistance Bactérienne aux Antibiotiques. *Medecine du Maghreb*, **91** : 12-13.

**Yeh P.J., Hegreness M.J., Aiden A.P., Kishony R., (2009).** Drug interactions and the evolution of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol*, **7**: 460-466.

**Zeiger E., (2014).** Chapter 1 :Bacterial Mutation Assays. In Genotoxicity Assessment, Methods and Protocols. Editors: Dhawan A., Bajpayee M. Ed: Humana Press. Lucknow, UP, India. Pp: 3.

**Les références web:**

**Web 1 :** Comparaison de la structure du sulfamide, de l'acide para-aminobenzoïque et de l'acide folique (23/12/2015).

<http://www.123bio.net/cours/antibio/sulfamides.html>

**Web 2:** Cycle de la résistance aux antibiotiques (10/05/2015).

<https://www.pinterest.com/pin/318911217333722236>

**Web 3 :** les grandes familles d'antibiotiques ainsi que leurs modes d'action sur les bactéries à Gram positif et Gram négatif (12/02/2015).

[http://www.memobio.fr/html/bact/ba\\_an\\_atbp.html](http://www.memobio.fr/html/bact/ba_an_atbp.html)

**Web 4 :** La mutation par substitution de paire de bases de type faux sens, des souches de *S. typhimurium* **TA100** et **TA1535** (15/10/2015).

<http://www.ebpi-kits.com/Insertion%20Mutation.html>

**Web 5 :** La mutation par substitution de paire de bases de type non sens, des souches de *S. typhimurium* **TA100** et **TA1535** (15/10/2015).

<http://www.ebpi-kits.com/Missense%20Mutation.html>

**Web 6 :** La mutation frameshift (décalage du cadre de lecture) de la souche *S. typhimurium* **TA98** (15/10/2015).

<http://www.ebpi-kits.com/Deletion%20Mutation.html>

**Web 7 :** Principe de la réponse SOS (06/09/2015).

<http://www.hindawi.com/journals/jna/2010/592980/fig14/>

**Web 8 :** Protocole expérimental du Kit SOS Chromotest™ (20/01/2015).

<http://www.biotoxicity.com/images/Procedure/sos%20chromotest%20kit.pdf>

**Web 9 :** Nauplii d'*Artemia salina* après éclosion (10/11/2015)

<http://www.aquacare.de/bilder/produkte/artemia0005.jpg>





***RESUMES***

## Résumé

L'augmentation et la dissémination rapide de la résistance bactériennes aux antibiotiques sont probablement l'un des problèmes de santé publique les plus inquiétants. La synthèse de nouvelles molécules antibactériennes, constitue une des alternatives actuelles pour pallier aux insuffisances des antibiotiques disponibles.

Le but de notre travail est d'évaluer l'activité antibactérienne de deux séries de sulfamides néosynthétisées **1a-d** et **2a-f**, ainsi que leur potentiel cytotoxique et génotoxique.

Tout d'abord, 262 souches cliniques (à Gram positif et à Gram négatif) ont été isolées, identifiées et testées contre les antibiotiques standards. L'antibiogramme ainsi que l'évaluation de l'activité antibactérienne des nouvelles molécules a été réalisés par la méthode de diffusion sur milieu solide. La CMI et la cinétique d'évolution des sulfamides ont été évalués sur milieu liquide. L'évaluation de la stabilité structurale et de l'activité antibactérienne en fonction du temps de conservation a été déterminée par CCM et sur les souches de références. L'évaluation de l'effet cytotoxique a été réalisée par le test de létalité sur les nauplii d'*Artemia salina* en déterminant la CL50. L'évaluation de l'effet génotoxique a été réalisée par le test d'Ames ainsi que le SOS Chromotest.

Les résultats obtenus montrent que la première série de sulfamides **1a-d** a montré une importante activité antibactérienne avec des diamètres de zones d'inhibition et des CMI intéressantes ; la molécule **1a** n'a donné d'activité qu'avec les souches à Gram positif. La deuxième série de sulfamides a donné une bonne activité antibactérienne avec la totalité des souches cliniques montrant des taux de sensibilité allant jusqu'à 100%. L'état de stabilité structurale et fonctionnelle de toutes les molécules a été confirmé.

L'évaluation de la cytotoxicité a révélée que seule la molécule **1a** était cytotoxique vis-à-vis des nauplii d'*A. salina*. L'évaluation de la génotoxicité par le test d'Ames utilisant 3 souches de *S. typhimurium* TA100, TA98 et laTA1535 a montré que les molécules **1a**, **1b** et **1d** de la première série ont un effet génotoxique, ainsi que les 3 molécules cycliques **2d-f** de la deuxième série. Les résultats du SOS Chromotest confirment ces résultats.

Seules les molécules **1c**, **2a**, **2b** et **2c** ayant une bonne activité antibactérienne, pas d'effet cytotoxique ni génotoxique (mutagène) peuvent présenter un espoir thérapeutique dans la lutte contre les bactéries multirésistantes.

**Mots clés :** Activité antimicrobienne, Cytotoxicité, Génotoxicité, Résistance bactérienne, SOS Chromotest, Test d'Ames.

## Summary

The rise and rapid spread of bacterial resistance to antibiotics are probably one of the most alarming public health problems. The synthesis of new antibacterial molecules is one of the current alternatives to overcome the shortcomings of the available antibiotics.

The aim of our study was to evaluate the antibacterial activity of two series of newly synthesized sulfonamides **1a-d** and **2a-f**, and the assessment of their cytotoxic and genotoxic effects.

First, 262 clinical strains (Gram positive and Gram negative) were isolated, identified and tested. The antibiogram and the evaluation of the antibacterial activity of the new compounds have been made by the diffusion method on solid medium. The MIC and the kinetic's evaluation sulfonamides were evaluated on liquid medium. The evaluation of the stability and antibacterial activity were determined by MCC using reference strains. The evaluation of the cytotoxic effect was realized by the lethality test using nauplii of *Artemia salina* by the determination of the LC50. The evaluation of the genotoxic effect was realised by the Ames test and the SOS Chromotest.

The results showed that the first series of sulfonamide **1a-d** gave a good activity with the majority of the tested clinical isolates, with interesting inhibition zone diameters and MIC; the molecule **1a** gave activity only with Gram positive bacteria.

The second series **2a-f** gave a good antibacterial activity with the totality of the clinical strains. The diameters of the inhibition zones and MIC are also important showing sensitivity rates of 100%. The structural and functional stability of all the molecules was confirmed.

The evaluation of the cytotoxic effect on *A. salina* revealed that only the **1a** molecule was cytotoxic. The evaluation of genotoxicity by Ames test using the 3 strains of *Salmonella typhimurium* TA100, TA98 and TA1535 showed that **1a**, **1b** and **1d** molecules of the first series of sulfonamids were genotoxic, the three cyclic molecules of the second series of sulfonamides **2d-f** were also genotoxic. The results of the SOS Chromotest confirmed these results.

At last, only **1c**, **2a**, **2b** and **2c** molecules that had a good antibacterial activity, no cytotoxic and genotoxic effects could present a therapeutic hope in the fight against multiresistant drug bacteria.

**Keywords:** Ames test, Antimicrobial activity, Cytotoxicity, Genotoxicity, SOS Chromotest.

## الملخص

ارتفاع وسرعة انتشار مقاومة البكتيريا للمضادات الحيوية هي على الأرجح واحدة من مشاكل الصحة العامة الأكثر إثارة للقلق. تركيب جزيئات مضادة للجراثيم، هي واحدة من البدائل الحالية للتغلب على أوجه القصور في المضادات الحيوية المتاحة. الهدف من دراستنا تقييم النشاط المضاد للبكتيريا من سلسلتين من السلفوناميدات مصنعه حديثا **1a-d** و **2a-f**، السمية الخلوية وقدرتها السامة للجينات.

أولاً، تم عزل سلالة بكتيرية *Gram positif et Gram négatif*، 262، تم تحديدها واختبارها. تم اختبار الحساسية للمضادات الحيوية وتقييم نشاط الجزيئات الجديدة المضادة للبكتيريا من خلال طريقة نشر على وسط صلب. تم تقييم CMI و تطور حركية CMI السلفوناميدات على الوسط السائل. تم تحديد تقييم الاستقرار الهيكلي والنشاط المضاد للبكتيريا باستعمال CCM و السلالات المرجعية.

و جرى تقييم تأثير السمية الخلوية بالاختبار على يرقات *Artemia salina* عن طريق تحديد LC50. تم إجراء تقييم لتأثير السمية عن طريق اختبار Ames و SOS Chromotest. النتائج التي تم الحصول عليها تشير إلى أن السلسلة الأولى من السلفوناميدات **1a-d** أعطت نتيجة جيدة مع أغلبية السلالات البكتيرية، بأقطار منطقة التثبيط و CMI مثيرة للاهتمام، الجزيء **1a** لم تسفر عن نشاط الا مع سلالات البكتيريا *Gram positif*. المجموعة الثانية أعطت نشاط مضاد للبكتيريا جيد مع جميع السلالات المجربة مع معدلات الحساسية تصل إلى 100٪، اقطار مناطق تثبيط و CMI مهمة أيضاً.

كشف تقييم السمية الخلوية ان جزيء **1a** كان وحده ساما ليرقات *Artemia salina*. تقييم السمية الجينية بواسطة اختبار أميس باستخدام 3 سلالات السالمونيلا التيفية TA100، TA98 و TA1535 تبين أن 3 جزيئات السلفوناميدات **1a**، **1b** و **1c** لها تأثير السمية، و 3 جزيئات دورية **2d-f** هي أيضاً لها تأثير السمية الجينية. نتائج SOS Chromotest تؤكد هذه النتائج.

في النهاية، ما عدا الجزيئات **1c**، **2a**، **2b** و **2c** التي لها نشاط جيد مضاد للجراثيم، ليست سامة للخلايا و ليس لها تأثير السمية الجينية تشكل أمل علاجي في مكافحة البكتيريا المتعددة المقاومة.

**الكلمات المفتاحية:** اختبار Ames، السمية الجينية، السمية الخلوية، النشاط المضاد للبكتيريا، SOS Chromotest.



***PRODUCTIONS  
SCIENTIFIQUES***

## *Productions Scientifiques*

### Liste des articles :

#### ❖ *Articles de la thèse :*

- 1) **Becheker I.**, Berredjem H., Boutefnouchet N., Berredjem M., Ladjama A. (2014). Antibacterial activity of four sulfonamide derivatives against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 6(11): 893-899.
- 2) Boufas W., Dupont N., Berredjem M., Berrezag K., **Becheker I.**, Berredjem H., Auf N. (2014). Synthesis and antibacterial activity of sulfonamides. SAR and DFT studies, *Journal of Molecular Structure*, 1074 (25): 180-185.
- 3) Hessainia S., Bouchareb F., Cheloufi H., Berredjem M., Berredjem H., **Becheker I.**, Aouf N. (2013). Efficient synthesis and antibacterial activity of novel cyclic sulfamides. *Rasayen J Chem*, 6(3): 175-182.

#### ❖ *Article hors thèse:*

Amira A., K'tir H., **Becheker I.**, Ouarna S., Inguimbert N., Berredjem H., Berredjem M., Aouf N. (2015). A new family of 1,2,5-thiadiazolidine 1,1-dioxides: Synthesis, structure and antibacterial activity. *Der Pharma Chemica*, 7(7): 213-219.

### Liste des communications :

#### ❖ *Communications internationales :*

#### Communications affichées :

- 1) Activité antibactérienne d'un sulfamide neosynthétisé vis-à-vis de 22 souches de *S. aureus*  
**Becheker Imène**, Berredjem Hajira et Berredjem Malika.  
1<sup>er</sup> congrès Internationale de Biotechnologie D'Annaba : Challenge et Perspectives, 19 et 20 Novembre 2011, Faculté de Medecine, Annaba.
- 2) Evaluation de l'activité antibactérienne d'une molécule appartenant à une nouvelle classe d'hétérocycles contenant un groupement sulfonyl vis-à-vis de 40 souches de *S. aureus*.  
**Becheker Imène**, Berredjem Hajira, Berredjem Malika, Bouacha Mabrouka et Aouf Nouredine.  
23<sup>ème</sup> Forum internationale des sciences biologiques et de biotechnologie de l'Association Tunisienne Des Sciences Biologiques, 21 au 24 Mars 2012.

3) Evaluation of the antibacterial activity and the kinetic of a new heterocyclic molecule carrying a sulfonyl group against *S. aureus*.

**Becheke Imène**, Berredjem Hajira, Berredjem Malika.

4th International Workshop on Industrial Biotechnology, 10 et 11 Avril 2013, Tlemcen-Algérie.

4) Evaluation du potentiel génotoxique du Bis(benzyl) sulfamide, in vitro, par le test d'Ames.

**Becheke Imène**, Berredjem Hadjira, Berredjem Malika, Ladjama Ali.

1<sup>er</sup> Congrès International de Biotoxicologie et Bioactivité, 26 et 27 Novembre 2014, Oran-Algérie.

5) Evaluation de l'activité Antibactérienne et de l'Effet Génotoxique du Bis(benzyl) sulfamide et du Cyclo-Bis(benzyl) sulfamide Néosynthétisés

**Becheke Imène**, Berredjem Hadjira, Berredjem Malika, Ladjama Ali.

Première Conférence Internationale de Guelma sur les Hépatites Virale (CIGH) : Est-ce que l'ère des hépatites virales a débuté ?, 09 Avril 2015, Université de Guelma.

### **Communications orales :**

6) Evaluation de l'activité antibactérienne et de l'effet génotoxique du Bis(propyl) Sulfamide et du Cyclo-Bis(propyl) Sulfamide néo-synthétisés.

**Becheke Imène**, Berredjem Hadjira, Berredjem Malika, Ladjama Ali.

Séminaire International des Biotechnologies (SIBC), 19, 20 et 21 Octobre 2015, Université de Constantine.

7) Evaluation de l'activité antibactérienne, l'effet cytotoxique et génotoxique d'une série de sulfamides néosynthétisée (**1a-d**).

**Becheke Imène**, Berredjem Hadjira, Berredjem Malika, Ladjama Ali.

Troisième Journées Internationales de Chimie Organique de Annaba-JICOA'15, 5, 6 et 7 Décembre 2015, Université de Annaba.

### **❖ *Communications nationales :***

### **Communications affichées :**

1) Sensibilité des souches de *Staphylococcus aureus* vis-à-vis de trois molécules innovantes de sulfonamides dérivés de benzylamine, propylamide et phenylamine.

**Becheke Imène**, Berredjem Hajira, Hessainia Sihem, Berredjem Malika, Aouf Noureddine.

Deuxièmes Journées Nationales de Chimie de Annaba-JNCA'13, 9, 10 et 11 Avril 2013.

2) Sensibilité de 40 souches cliniques vis-à-vis d'une molécule innovante de sulfonamide dérivé de propylamine.

**Becheke Imène**, Berredjem Hajira, Hessainia Sihem., Berredjem Malika.

6<sup>ème</sup> journée de méthodologie en recherche clinique : Maitrise de la clinimétrie et bonnes pratiques cliniques, 23 Mai 2013, Faculté de Medecine, Annaba.

3) Evaluation de l'activité antibactérienne de 3 nouvelles molécules de Cyclosulfamides vis-à-vis des souches uropathogènes.

**Becheker Imène**, Berredjem Hadjira, Berredjem Malika, Ladjama Ali.

Journées Urologiques Nationales d'Annaba, 12 et 13 Juin 2015, Faculté de Medecine, Annaba.

4) Profil de résistance aux antibiotiques des souches uropathogènes responsables d'infections nosocomiales et communautaires dans la ville d'Annaba.

**Becheker Imène**, Berredjem Hadjira, Berredjem Malika, Ladjama Ali.

Journées Urologiques Nationales d'Annaba, 12 et 13 Juin 2015, Faculté de Médecine, Annaba.

### **Communication orale :**

Test de photosensibilité par UV et évaluation de l'activité antibactérienne d'une nouvelle molécule de sulfamide dérivée de benzylamine.

**Becheker Imène**, Djebari Amina, Djebiha Nawel, Berredjem Hajira, Berredjem Malika.

XVIIIèmes Journées Nationales de Microbiologie, 27 Novembre 2012, Tizi Ouzou- Algérie.

### **Prix de meilleures communications :**

#### ***1<sup>er</sup> Prix de la meilleure communication affichée***

1<sup>er</sup> congrès Internationale de Biotechnologie D'Annaba : Challenge et Perspectives, 19 et 20 Novembre 2011, Faculté de Medecine, Annaba.

#### ***1<sup>er</sup> Prix de la meilleure communication affichée,***

##### ***Catégorie : Biotechnologie et Santé***

4<sup>th</sup> International Workshop on Industrial Biotechnology, 10 et 11 Avril 2013, Tlemcen-Algérie.





## Antibacterial activity of four sulfonamide derivatives against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*

Imène Bechecker<sup>1</sup>, Hajira Berredjem<sup>1\*</sup>, Nafissa Boutefnouchet<sup>1</sup>, Malika Berredjem<sup>2</sup> and Ali Ladjama<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Applied Biochemistry and Microbiology, Faculty of Sciences, Department of Biochemistry, University of Badji Mokhtar, Annaba, Algeria

<sup>2</sup>Laboratory of Applied Organic Chemistry, Synthesis of Biomolecules and Molecular Modelling Group, Faculty of Sciences, Department of Chemistry, University of Badji Mokhtar, Annaba, Algeria

### ABSTRACT

This study aims to evaluate, *in vitro*, antibacterial activity of four novel sulfonamide derivatives (**1a-d**) against *Staphylococcus aureus*: reference strain ATCC 25923 and 40 clinical isolates. Inhibition zones were performed with the disk diffusion method. The MIC values were determined by the dilution broth method. A 48 hours MIC-Kinetic curve was performed for the tested compounds. All compounds showed significant antibacterial activity. The mean values of the inhibition zones diameter for compounds **1a-d** were  $22.15 \pm 6.22$ ,  $16.39 \pm 1.17$ ,  $15.42 \pm 0.66$  and  $15.83 \pm 1.28$  mm, respectively ( $p$  value = 0.001). The MIC values were ranged between 64 and 512  $\mu\text{g/ml}$ . The compound **1b** showed better activity. The 48 hours MIC-kinetic curve showed an inhibiting bacterial growth. The studied compounds **1a-d** showed a promising antibacterial effect to response to the urgent need for innovative drugs that could be more effective against resistant pathogens.

**Keywords:** Antibacterial activity, Sulfonamides, *Staphylococcus aureus*, MIC.

### INTRODUCTION

Sulfonamides are among the most widely used antibacterial agents in the world. They were the first effective chemotherapeutic agents used systematically for the prevention and cure of bacterial infections in humans and some animals, mainly because of their low cost, low toxicity and excellent activity against bacterial diseases [1]. The sulfonamide  $-\text{SO}_2\text{NH}-$  group occurs in numerous biologically active compounds that constitute an important class of drugs used extensively as pharmaceutical and agricultural agents [2]. Many sulfonamide derivatives were synthesized, characterized and tested for antibacterial [3], anti-tumour [4,5] anti-carbonic anhydrase [6,7], diuretic [8,9], hypoglycemic properties [10], antithyroid [11], anti-inflammatory [5], and other biological activities [4,5].

Unfortunately, the abuse of antibiotics has led to the emergence of drug-resistant strains which have a significant impact on the patients' morbidity and mortality. In some cases, the formerly effective antimicrobial agents are no longer useful [12,13].

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) is the most frequent resistant bacterium in the vast majority of the clinical isolates. It is a common human pathogen responsible for a significant number of infections worldwide such as skin and soft tissue infections, septicemia, pneumonia, endocarditis and deep abscesses; which have long been considered as hospital-acquired [14]. However, the epidemiology of *S. aureus* is changing because of its ability to adapt to varying environmental conditions [15]. New community-acquired strains, which differ from nosocomial strains in their susceptibility to various antibiotics, have appeared. *S. aureus* have rapidly become resistant above all

antibiotics, such as methicillin (MRSA: methicillin resistant *S. aureus*) [16,17], and recently to the vancomycin (VRSA: vancomycin resistant *S. aureus*), which previously represented the treatment of choice [18-20].

Even though the arsenal of antibacterial molecules available is considerable, it cannot solve all these problems [21]. Therefore, a clear need is required for the development of innovative antimicrobial agents with better pharmacological profiles. The aim of this study is to assess the *in vitro* activity of four innovative antimicrobial sulfonamide derivatives against *S. aureus*. We realize at the same time a MIC-kinetic curve for the inhibition activity of the new molecules.

## EXPERIMENTAL SECTION

### Bacterial strains

A total of 40 clinical *S. aureus* strains were used in this study. The isolates collected from public and private sanitary establishments were mainly isolated from different samples: 21 pus (52.50%), 9 urine (22.50%), 6 blood (15%), and 4 protected distal sampling (PDS) (10%).

The identification of the bacterial strains was made on cultural and biochemical characters (API staph system, BioMérieux, France). The *S. aureus* ATCC 25923 was used as a control (Pasteur Institute, Algiers).

The commonly used method in routine laboratory practice for the detection of methicillin and vancomycin resistance is oxacilline (5mg, Bioanalyse<sup>®</sup>, Turkey) and vancomycin disc diffusion (30 mg, Bioanalyse<sup>®</sup>, Turkey).

### Tested compounds

The tested sulfonamide derivatives **1a-d** (Figure 1) were prepared in acetone and then serial dilutions were made in a concentration range from 0.5 to 512 µg/ml.

Two commercial drugs were used as positive control and were diluted in the same manner: Control 1: Bactrim, sulfamethoxazole-trimethoprim (400/80mg) (Laboratoire Roche, France), and control 2: Enteropathyl, Sulfaguanidine (500 mg) (Merck, France).

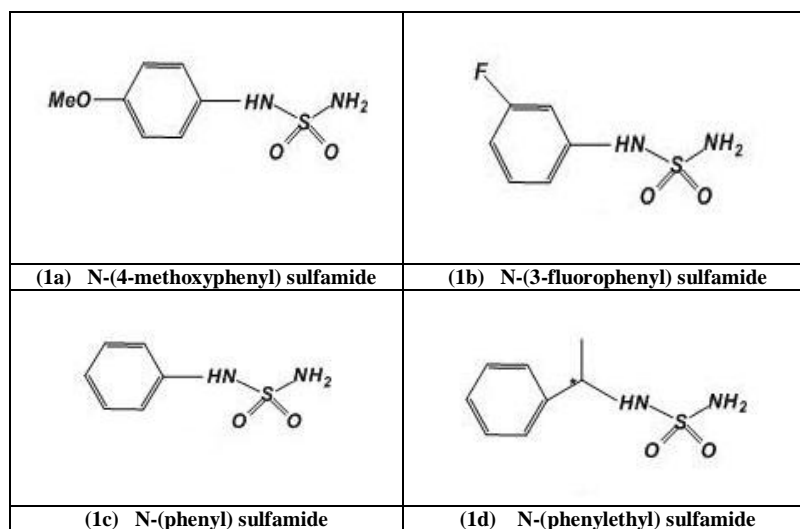


Figure 1: Chemical structure of the sulfonamide derivatives 1a-d

### Determination of inhibition zones

The newly synthesized compounds **1a-d** were screened for antibacterial activity against *S. aureus* ATCC 25923 and clinical isolates. Inhibition zones of the compounds were performed with the disk diffusion method [22]. The antimicrobial screening was performed using Mueller–Hinton agar that was poured into each sterile Petri dish, allowed to solidify and finally seeded with a bacterial inoculum prepared in physiological sterile water with an OD<sub>625</sub> about 0,08. Empty sterilized disks of 6 mm (Schleicher and Schule, Germany) were each impregnated with 20 µl of the different concentrations of the compounds. Disks were placed on agar plates and the cultures were incubated at 37°C for 24 hrs.

The standard drugs, control 1 and 2, were used as positive controls. Disks embedded with acetone were used as a negative one. Inhibition zones formed on the medium were evaluated in millimeter (mm). All tests were performed in duplicate, and experiment was repeated three times.

#### **Minimal inhibitory concentration**

The minimum inhibitory concentration (MIC) values of compounds **1a-d** were determined by the dilution broth method following the procedures recommended by the CLSI [22].

All tests were performed in Mueller–Hinton broth. Bacterial inoculum with an OD<sub>625</sub> about 0.08 was added to each tube containing compound at geometric dilutions ranging from 0.5 to 512 µg/ml; a control tube without compound was used. The tubes were incubated at 37°C for 24 hrs. The results were recorded according to the presence or absence of bacteria growth comparatively to the controls. As previously, control 1 and 2 were used as positive controls. Two replicates were done for each compound, and experiment was repeated three times.

#### **Minimal bactericidal concentration**

The minimal bactericidal concentration (MBC) was carried out to assess the concentrations of the compounds that can kill or inhibit the growth of the tested organisms. Absence of growth was interpreted as bactericidal action while growth represented a bacteriostatic action [22]. The MBC was established on nutritive agar by sub-culturing, at 37°C for 24 hrs, 0.1 ml of tubes showing no turbidity at MIC concentration of the tested compounds.

#### **MIC-kinetic curve**

Bacterial suspensions were prepared in physiological sterile water (OD<sub>625</sub> was approximately 0.08) and then inoculated in fresh Muller-Hinton broth. Compounds **1a-d** were added in MIC concentration as previously determined. A control was used to show bacterial growth without the presence of any compound.

The DO<sub>625</sub> was taken before incubation and then each 2 hrs after incubation at 37°C: 0; 2; 4; 6; 8; 10; 12; 14; 16; 18; 24 and 48 hrs. Samples were removed from each tube at each time point indicated above.

#### **Statistical analysis**

Data analysis was performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by *t* student test. All the results were expressed as mean ± S.E.M. (standard error of the mean). Statistical significance was considered at *p* < 0.05.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

#### **Determination of inhibition zones**

As shown in Table 1, the diameter of inhibition zones values of tested compounds **1a-d** against the reference strain *S. aureus* ATCC 25923 were ranged between 15 and 34 mm. Values for control 1 and control 2 were 24 and 16 mm respectively.

**Table 1: The MIC and the diameter of growth inhibition zones values of tested compounds 1a-d against *S. aureus* ATCC 25923**

Tested compounds	Diameter of inhibition zones (mm)	MIC (µg/ml)
<b>1a</b>	34	256
<b>1b</b>	15	64
<b>1c</b>	15	128
<b>1d</b>	16	128
<b>Control 1</b>	24	32
<b>Control 2</b>	16	512

**Table 2: Percentage (%) of *S. aureus* resistance/sensibility against tested compounds 1a-d**

Tested compounds	resistant Strains		sensible strains	
	(%)	(N)	(%)	(N)
<b>1a</b>	21,96	9	<b>78,04</b>	32
<b>1b</b>	21,96	9	<b>78,04</b>	32
<b>1c</b>	21,96	9	<b>78,04</b>	32
<b>1d</b>	19,52	8	<b>80,48</b>	33
<b>Control 1</b>	34,17	14	<b>65,83</b>	27
<b>Control 2</b>	<b>85,37</b>	35	14,63	6

Among the 40 clinical strains, 9 (21.96%) were resistant towards the new compounds whereas resistance towards control 1 and 2 were 34.17% and 85.37% respectively (Table 2). Therefore, all the synthesized compounds **1a-d**

exhibited a good antibacterial activity with a varying degree of inhibitory effect on the growth of the tested microbial strains. These results were comparative to the reference strain ones.

The diameters of inhibition zones values were expressed as an interval of measures (Table 3). The highest diameters of inhibition zones for the test compounds **1a-d** were obtained in the interval [30-34] ( $31.8 \pm 1.83$  mm) for **1a**, [15-19] ( $16.54 \pm 1.00$  mm) for **1b**, [15-19] ( $15.51 \pm 0.55$  mm) for **1c** and [15-19] ( $16.5 \pm 1.08$  mm) for **1d**.

The results vary between 14-34 mm for the compound **1a**, 14-18 mm for the compounds **1b** and **1d**, and 14-17 mm for the compound **1c**; the highest percentage of sensitive strains is obtained in the interval [15-19].

Compound **1a** inhibited the growth of pathogens, particularly MRSA (28 strains) and VRSA (7 strains), better than compounds **1b-d** and the control 2.

The solvent control (acetone) did not show any antimicrobial activity.

**Table 3: Percentage (%) of *S. aureus* strains relative to the intervals of the inhibition zones of the tested compounds 1a-d**

Tested compounds	Percentage (%) of <i>S. aureus</i> strains relative to the inhibition zones intervals (mm)						
	[0-4]	[5-9]	[10-14]	[15-19]	[20-24]	[25-29]	[30-34]
<b>1a</b>	21,97	0	7,31	<b>24,39</b>	14,63	19,51	12,19
<b>1b</b>	19,51	0	4,89	<b>75,60</b>	0	0	0
<b>1c</b>	19,51	0	4,89	<b>75,60</b>	0	0	0
<b>1d</b>	19,52	0	7,31	<b>73,17</b>	0	0	0
<b>Control 1</b>	<b>39,04</b>	0	0	14,63	21,95	14,63	9,75
<b>Control 2</b>	<b>53,67</b>	0	34,14	12,19	0	0	0

#### Determination of the MIC

As shown in Table 2, the MIC values of tested compounds **1a-d** against the reference strain *S. aureus* ATCC 25923 were ranged between 64 and 256  $\mu\text{g/ml}$ . Values for control 1 and 2 were respectively 32 and 512  $\mu\text{g/ml}$ .

For the clinical strains, the antibacterial results (Table 4) evidently shown that the new series of sulfonamide derivatives possess a good concentration-dependent antibacterial activity against the tested bacteria at MIC values between 64 and 512  $\mu\text{g/ml}$ . Among the screened compounds, **1b-d** showed good activity against all the bacterial strains, compared to the control 2.

Antibacterial screening revealed that the tested compound **1b** showed promising activity with the lowest MIC 64  $\mu\text{g/ml}$  for 51.61% of tested strains whereas the compounds **1c-d** showed activity for the same concentration respectively for 12.12% and 24.24% of tested strains. The compound **1a** was found to be active on 53.12% of the tested strains at higher concentration 512  $\mu\text{g/ml}$ .

**Table 4: Percentage (%) of *S. aureus* strains relative to the different MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ) of the tested compounds 1a-d**

tested compounds	Percentage (%) of <i>S. aureus</i> strains relative to the different MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )										
	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512
<b>1a</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	46,87	<b>53,12</b>
<b>1b</b>	-	-	-	3,22	-	-	-	<b>51,61</b>	22,58	19,35	3,22
<b>1c</b>	-	-	-	-	-	-	-	12,12	<b>42,42</b>	27,27	18,18
<b>1d</b>	-	-	-	-	-	-	3,03	24,24	<b>39,39</b>	21,21	12,12
<b>Control 1</b>	-	-	-	<b>33,33</b>	11,11	7,40	18,51	29,62	-	-	-
<b>Control 2</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>14,63</b>

(-): negative.

#### Determination of the MBC

The bacterial count determined a number greater than  $10^2$  UFC/ml in all Petri dishes, which corresponds to 0.01% of the initially number of bacteria. According to these results of MBC study, the synthesized compounds **1a-d** are bacteriostatic.

#### Kinetic Curve

The kinetic curve of the MIC for 48 hrs showed that the antibacterial activity of the new series of sulfonamide derivatives occurs during the first hours of incubation by inhibiting bacterial growth. The optical density (OD) was low and equal to the initial seeding rate of bacterial strains, as compared to the control one, which showed an exponential growth of the bacteria (Figure 2).

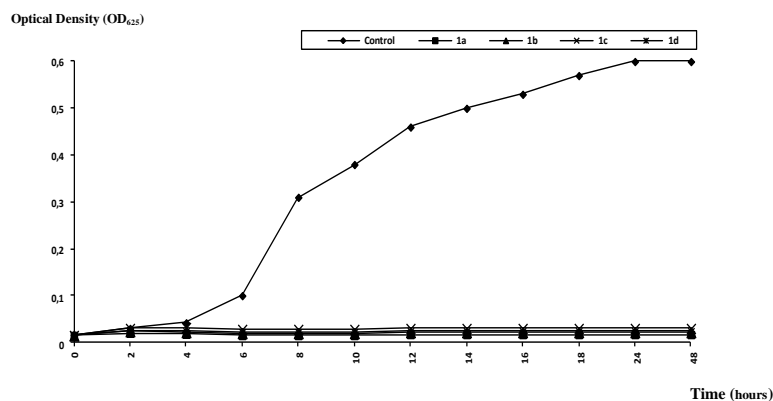


Figure 2: MIC-kinetic curves of clinical *S. aureus* strains for the tested compounds 1a-d

In the 1960s, antibiotics have emerged as a revolution; they healed in a few days deadly infections, wound infections, and food intoxications. Diseases such as syphilis or tuberculosis appeared to be eradicated, and ancient scourges, such as plague and cholera, were mastered [23]. The treatment of bacterial infections is made more complex because of the ability of bacteria to develop a variety of resistance mechanisms to numerous therapeutic agents. Many authors have described this phenomenon as the end of the era of antibiotics [24]. In reality, emerging and re-emerging infectious diseases have left us facing drug resistant organisms, which remain an important problem in clinical practice that is difficult to solve [16]. Drug-resistance bacteria, especially the *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pneumoniae* ... kill more than two million people each year and endanger human health seriously [25]. However, the number of new antibiotics has precipitously declined over the last 25 years. A decrease of almost 75% was observed for systemic antibiotics, approved by the FDA (American Food and Drug Administration) between 1983 and 2007, and this decline is particularly important for five years (2003-2007) [26]. This rapid evolution of bacterial resistance to the most marketed antibiotics encourages the discovery of new molecules with a good pharmacokinetic profile. Therefore, developing new antimicrobial agents continues to attract attention and is an area of rigorous research. Although a large number of antibiotics and chemotherapeutics are available for medical use, the antimicrobial resistance created an increasing need of new antimicrobial agents [27,28].

Sulfonamides were the first effective chemotherapeutic agents employed systematically for the prevention and cure of bacterial infections in humans and other animal systems [29]. The importance of the sulfonamide has been achieved when the sulfonylamide, sulfonamide analogue key, has been reported to be the first antibacterial drug. Later, many sulfonylamide derivatives were synthesized, characterized and tested for their biological activities [30,31].

In this study, new series of four synthetic sulfonamide derivatives **1a-d** were screened for the *in vitro* antimicrobial activity against Gram positive bacteria, a reference strain *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and 40 clinical strains of *S. aureus*. There has been a predominance of strains isolated from pus (51.28% of samples), comparatively to the other biological samples. These findings corroborate the previous study done by Elhamzaoui *et al.* [32] which showed a predominance of 62.70% for *S. aureus* strains isolated from pus.

The tested compounds demonstrate a significant antibacterial activity against the *S. aureus* strains which showed a high sensibility of 78.04% and 80.48% comparatively to the standard antibiotics. In fact, when conventional antibiotics were used for an antibiogram (data not shown), the clinical *S. aureus* strains presented an important multidrug-resistance; the rates of resistance were as follows: B-Lactam antibiotics (89.02%), aminoglycosides (Aminosides) (75.12%) and quinolones (60.97%). High resistance was obtained with different antibiotics: Rifampicin (95.12%), fusidic acid (80.48%), sulphonomides (90.24%), pristinamycin (56.09%) and tetracyclin (60.97%).

The *in vitro* evaluation of the antibacterial activity of the sulfonamide derivatives **1a-d** has highlighted an important dose-dependent antibacterial activity, which results in the appearance of the inhibition zones. The MIC kinetic curve during 48 h showed that the antibacterial activity of the new molecules appears since the first hours of incubation and inhibits the bacterial growth. Among the 40 clinical isolated strains, 32 (80%) showed inhibition zones  $\geq 14$

mm, reflecting their sensitivity to the new effective compounds. Regarding control 2, 86.37% of the tested strains were resistant.

Compounds **1b**, **1c** and **1d** inhibited the growth of pathogen particularly MRSA and VRSA. Even though the synthesized compounds showed a good antibacterial activity, control 1 exhibited a better activity with a MIC equal to 4 µg/ml.

Among the four molecules, the compounds **1b-d** showed good antibacterial activity as indicated by MIC values equal to 64 µg/ml while the compound **1a** showed moderate antibacterial activity with a MIC value equal to 256-512 µg/ml. When compounds are compared with each other, **1b** was found to be more active at the lower concentration 64 µg/ml against 51.61% of studied strains. The presence of electron donating and withdrawing groups, size and shape of molecule, might be influencing the selective antibacterial activity. Aromatic fluorine substituent improves bioavailability and increases potency. It was therefore concluded that the presence of fluor moiety, in addition to phenyl group, was found to be essential for its high antibacterial activity. Kumar M. *et al.* [33] indicate in their study that the presence of phenyl ring attached to the sulfonamide moiety increased the antimicrobial potential of the synthesized compounds against the tested microbial strains; these results are coherent with our results. Ozdemir *et al.* [30] carried out a study on a *S. aureus* ATCC 25923 strain; six sulfonamide derivatives and their complexes gave MIC values between 220 and 413 µg/ml. These values are higher than ours (128- 64 µg/ml). Ever more, Chohan *et al.* [34] determinate the antibacterial activity of some new biologically active metal-based sulfonamides on a *S. aureus* strain; the diameters of the inhibition zones vary between 12 and 26 mm. and corroborate our results (15 and 34mm). Another study was carried out by Messah *et al.* [35] on a reference strain *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and a clinical strain for a new series of five N-acylsulfonamides. When compared to our findings, the reference strain showed the same results. The MICs obtained for the clinical strain vary between 256-512 µg/ml for three compounds as the results of compound **1a**. Among the five N-acylsulfonamides, two had MIC between 128-64 µg/ml, which were comparable with our tested compounds **1b-c**.

Compared to the antibacterial potential of our studied sulfonamide compounds **1a-d**, N-acylsulfonamide synthesized by Berredjem *et al.* [36] didn't show any activity on the Gram positive bacteria (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *S. aureus* isolates).

However, traditional methods of measuring antibiotic efficacy such as the MIC are insufficient for understanding the complex dynamics that lead to the rapid development and spread of antibiotic resistance within bacterial populations. The ability to investigate the relationship between individual molecular components of the system and the overall treatment outcome can lead to a better understanding of how to optimize antibiotic performance and to predict treatment outcome [37].

## CONCLUSION

The antibacterial activity results of the studied compounds revealed that all the synthesized sulfonamides showed very good inhibitory characteristics. Among the screened molecules, compound **1b** with stronger conjugation effect of fluor in the benzene ring, was noticeable as the most active antibacterial agent against MRSA, VRSA. The studied products are still under investigation. Their antibiotic properties have promising applications in the control of infections.

## Acknowledgement

This work was supported by the Algerian Ministry of High Education and Scientific Research, under the number: F01120110054.

## REFERENCES

- [1] MG Papich, JE Riviere. Fluoroquinolone antibacterial drugs: Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 9<sup>th</sup> Edition, Wiley-Blackwell, Iowa State University Press, USA, **2009**, 983-1011.
- [2] P Jain; C Saravanan; S Kumar Singh, *Europ. J. Med. Chem.*, **2013**, 60, 89-100.
- [3] G Melagraki; A Afantitis; H Sarimveis; O Igglessi-Markopoulou; CT Supuran, *Bioorg. Med. Chem.*, **2006**, 14(4), 1108-1114.
- [4] N Anand, ME Wolff. Burger's medicinal chemistry and drug discovery. In Therapeutic Agents, 5<sup>th</sup> Edition, J. Wiley & Sons, New York, **1996**, 527-544.
- [5] P Ortqvist; SD Peterson; E Kerblom; T Gossas; YA Sabnis; R Fransson; G Lindeberg; HU Danielson; A Karlén; A Sandström, *Bioorg. Med. Chem.*, **2007**, 15, 1448-1453.

- [6] D Mandloi; S Joshi; PV Khadikar; N Khosla, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2005**, 15(2), 405-411.
- [7] D Vullo; B Steffansen; B Brodin; CT Supuran; A Scozzafava; CU Nielsen, *Bioorg. Med. Chem.*, **2006**, 14(7), 2418-2427.
- [8] TH Maren, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **1976**, 16, 309-314.
- [9] AE Boyd, *Diabetes*, **1988**, 37, 847-850.
- [10] CW Thornber, *Chem. Soc. Rev.*, **1979**, 8, 563-567.
- [11] MA Santos; SM Marques; T Tuccinardi ; P Carelli ; L Panelli ; A Rossello, *Bioorg. Med. Chem.*, **2006**, 14(22), 7539-7550.
- [12] R Bhatia ; JP Narain, *Asia Pac. J. Public Health*, **2010**, 22(4), 388-394.
- [13] X Bertrand ; Y Costa ; P Pina, *Médecine et maladies infectieuses*, **2005**, 35(6), 329-334.
- [14] M Elazhari ; R Saile ; N Dersi ; M Timimouni ; A Elmalki ; S Bouhali Zriouil ; M Hassar ; K Zerouali, *Europ. J. Scient. Res.*, **2009**, 30(1), 128-137.
- [15] Y Genç; R Özkanca; Y Bekdemir, *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.*, **2008**, 7, 17-21.
- [16] T Saga; K Yamaguchi, *JMAJ*, **2009**, 52(2), 103-108.
- [17] BL Roder; DA Wandall; N Frimodt-Moller; F Espersen; P Skinhoj; VT Rosdahl, *Arch. Inter. Med.*, **1999**, 159(5), 462-469.
- [18] DS Guttman, J Stavriniades, Population Genomics of Bacteria, in Bacterial Population Genetics in Infectious Disease, 1<sup>st</sup> Edition, John Wiley and Sons, USA, **2010**, 322-347.
- [19] S Thibaut; J Caillon; C Huart; G Grandjean; P Lombrail; G Potel; F Ballereau, *Médecine et maladies infectieuses*, **2010**, 40(2), 74-80.
- [20] SA Rebiahi ; DE Abdelouahid ; M Rahmoun ; S Abdelali ; H Azzaoui, *Médecine et maladies infectieuses*, **2011**, 41(12), 646-651.
- [21] JF Desnottes, *Antibiotiques*, **1999**, 11(2), 201-209.
- [22] Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. 9<sup>th</sup> Edition, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA, **2012** (CLSI publication M7-A9).
- [23] M Grare; S Fontanay; H Massimba Dibama; M Mourer; JB Regnouf-de-Vains; CE Finance; RE Duval, *Pathol. Biol.*, **2010**, 58(1), 46-51.
- [24] G Taubes, *Science*, **2008**, 61, 321-356.
- [25] PJ Yeh; MJ Hegreness; AP Aiden; R Kishony, *Nat. Rev. Microbiol.*, **2009**, 7(6), 460-466.
- [26] HW Boucher; GH Talbot; JS Bradley; JE Edwards; D Gilbert; LB Rice, *Clin. Infect. Dis.*, **2009**, 48(1), 1-12.
- [27] A Coates; Y Hu; R Bax; C Page, *Nat. Rev. Drug. Discov.*, **2002**, 1(11), 895-910.
- [28] JI Borrell; J Teixido; B Martinez-Teipel; JL Matallana; MT Copete; A Llimargas, *J. Med. Chem.*, **1998**, 41, 3539-3545.
- [29] N Özbek; S Alyar; S Mamas; E Sahin; N Karacan, *J. Molec. Struct.*, **2012**, 10, 1-7.
- [30] UO Ozdemir; P Guvenc; E Sahin; F Hamurcu, *Inorg. Chim. Acta.*, **2009**, 362, 2613-2618.
- [31] NS El-Sayed; ER El-Bendary; SM El-Ashry; MM El-Kerdawy, *Europ. J. Med. Chem.*, **2011**, 46(9), 3714-3720.
- [32] S Elhamzaoui; A Benouda; F Allali; R Abouqual; M Elouennass, *Médecine et maladies infectieuses*, **2009**, 39(12), 891-895.
- [33] M Kumar; B Narasimhan; K Ramasamy; V Mani; RK Mishra; ABA Majeed, *Arab. J. Chem.*, **2013**, DOI: 10.1016/j.arabjc.2013.11.009.
- [34] ZH Chohan; HA Shad; MH Youssoufi; T Ben Hadda, *Europ. J. Medic. Chem.*, **2010**, 45(7), 2893-2901.
- [35] AR Massah; H Adibi; R Khodarahmi; R Abiri; MB Majnooni; S Shahidi; B Asadi; M Mehrabib; MA Zolfigol, *Bioorg. Med. Chem.*, **2008**, 16, 5465-5472.
- [36] M Berredjem; F Bouchareb; S Ait Kaki; M Dekhil; N Aouf, *Arab. J. Chem.*, **2013**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.01.016>
- [37] JT Murphy; R Walshe; M Devocelle, *J. Theor. Biol.*, **2008**, 254(2), 284-293.



***ANNEXES***



## Annexe 1

### 1. Identification par API Staph des caractères biochimiques des souches cliniques de *Staphylococcus aureus* :

Caractères biochimiques	0	GLU	FRU	MNE	MAL	LAC	TRE	MAN	XLT	MEL	NIT	PAL	VP	RAF	XYL	SAC	MDG	NAG	ADH	URE	OX	MOB
<i>S. aureus</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+/-	-	-

### 2. Identification par API 20E des caractères biochimiques des souches cliniques d'enterobactéries :

Caractères biochimiques	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H <sub>2</sub> S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX	NO <sub>2</sub>	MOB
<i>E. coli</i>	+/-	-	+	+/-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+/-	+/-	+/-	-	-	+	-	+	+
<i>K. pneumoniae</i>	+	-	+	-	+	-	+/-	-	-	+/-	-	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+	-	+	-
<i>K. oxytoca</i>	+	-	+	+/-	+	-	+/-	-	+	+/-	-	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+	-	+	-
<i>P. mirabilis</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+/-	-	+/-	+	+/-	-	-	-	+/-	-	-	-	-	+	+
<i>P. vulgaris</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+
<i>E. cloacae</i>	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>E. aerogenes</i>	+	+/-	+/-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>E. faecalis</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+/-	+	+	-	+	+/-	+	-	+	-	-	+	-

<i>S. marcescens</i>	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+
<i>S. fonticola</i>	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
<i>S. odorifera</i>	+	-	+	-	+	-	-	-	+/-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+
<i>Salmonella sp.</i>	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+
<i>C. freundii</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+

**3. Identification par API 20 NE des caractères biochimiques des souches cliniques de *Pseudomonas aeruginosa* et d'*Acinetobacter baumannii* par:**

Caractères biochimiques	NO3	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNPG	GLU	ARA	MNE	MAN	NAG	MAL	GNT	CAP	ADI	MLT	CIT	PAC	OX	MOB
<i>P. aeruginosa</i>	+	-	-	+	+/-	-	+	-	+	-	-	+/-	+/-	-	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>A. baumannii</i>	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+/-	-	+	-	+/-	+	+	-	-

## Annexe 2

1. Les antibiotiques testés pour les souches de *Staphylococcus aureus* (Bio-Rad, France ; HIMEDIA, Inde ; OXOID, Royaume-Uni ; Bioanalyse, Turquie).

Antibiotiques	Abréviation	Charge du disque	Familles	
Pénicilline	P	10µg		β-lactamines
Oxacilline	OX	5µg		
Céfoxitine	FOX	30µg/ml	Céphalosporine de 2ème génération	
Tobramycine	TM	30µg/ml	Aminosides	
Amikacine	AK	10µg/ml		
Gentamicine	GM	10µg/ml		
Kanamycine	K	10µg/ml		
Streptomycine	S	10µg		
Ofloxacine	OFX	5µg/ml		Quinolones
Erythromycine	E	15µg	Macrolides	
Clindamycine	CN	2µg		
Lincomycine	L	10µg		
Pristinamycine	PT	15µg		
Vancomycine	VA	30µg		
Teicoplanine	TEC	30µg	Glycopeptides	
Triméthoprimé/ Sulfaméthoxazole	SXT	25µg	Sulfamides	
Sulfamides	SSS	200µg		
Colistine	CS	50µg/ml	Polymyxines	
Fosfomycine	FOS	50µg/ml	Fosfomycines	
Chloramphénicols	C	30µg/ml	Phénicols	
Tétracycline	TE	30µg	Tétracyclines	
Rifampicine	RA	30µg	Autres	
Acide fusidique	FA	10µg		

2. Les antibiotiques testés pour les souches d'*Enterococcus faecalis* (Bio-Rad, France ; HIMEDIA, Inde ; OXOID, Royaume-Uni ; Bioanalyse, Turquie).

Antibiotiques	Abréviation	Charge du disque	Familles	
Penicilline	P	10µg		β-lactamines
Oxacilline	OX	5µg		
Amoxicilline	AM	25µg		
Amoxicilline/acide clavulanique	AMC	30µg	Aminopénicillines+ inhibiteur de β-lactamase	
Cefoxitine	FOX	30µg/ml	Céphalosporine de 2ème génération	
Imipénème	IMP	10µg/ml	Carbapénèmes	
Tobramycine	TM	30µg/ml	Aminosides	
Amikacine	AK	10µg/ml		
Gentamicine	GM	10µg/ml		
Kanamycine	K	10µg/ml		
Streptomycine	S	10µg		
Ofloxacine	OFX	5µg/ml		
Ciprofloxacine	CIP	5µg/ml		
Erythromycine	E	15µg	Macrolides	
Clindamycine	CN	2µg		
Lincomycine	L	10µg		
Vancomycine	VA	30µg	Glycopeptides	
Triméthoprimé/ Sulfaméthoxazole	SXT	25µg	Sulfamides	
Sulfamides	SSS	200µg		
Chloramphénicol	C	30µg/ml	Phénicol	
Tétracycline	TE	30µg	Tétracyclines	
Furanes (nitrofurantoïne)	F	300µg	Furanes	
Rifampicine	RA	30µg	Autres	

3. Les antibiotiques testés pour les souches d'entérobactéries fermentaires (Bio-Rad, France ; HIMEDIA, Inde ; OXOID, Royaume-Uni ; Bioanalyse, Turquie).

Antibiotiques	Abréviation	Charge du disque	Familles	
Céftazidime	CAZ	30µg/ml	Céphalosporine de 3ème génération	β-lactamines
Céfotaxime	CTX	30µg/ml		
Céftriaxone	CRO	30µg/ml		
Céfalotine	CF	30µg/ml	Céphalosporine de 2ème génération	
Cefoxitine	FOX	30µg/ml		
Amoxicilline/ acide clavulanique	AMC	30µg/ml	Aminopénicillines+ inhibiteur de β-lactamase	
Aztréonam	ATM	5µg/ml	Monobactames	
Imipénème	IMP	10µg/ml	Carbapénèmes	
Ticarcilline	TIC	75µg/ml	Carboxpénicilline	
Tobramycine	TM	30µg/ml	Aminosides	
Amikacine	AK	10µg/ml		
Gentamycine	GM	10µg/ml		
Kanamycine	K	10µg/ml		
Ofloxacine	OFX	5µg/ml	Quinolones	
Acide nalidixique	NA	30µg/ml		
Ciprofloxacine	CIP	5µg/ml		
Triméthoprimé/ Sulfaméthoxazole	SXT	25µg/ml	Sulfamides	
Sulfamides	SSS	200µg/ml		
Colistine	CS	50µg/ml	Polymixine	
Fosfomycine	FOS	50µg/ml	Les fosfomycines	
Chloramphénicol	C	30µg/ml	Phénicol	
Tétracycline	TE	30µg/ml	Tétracycline	

4. Les antibiotiques testés pour les souches d'entérobactéries non fermentaires (Bio-Rad, France ; HIMEDIA, Inde ; OXOID, Royaume-Uni ; Bioanalyse, Turquie).

Antibiotiques	Abréviation	Charge du disque	Familles	
Céftazidime	CAZ	30µg	Céphalosporine de 3ème génération	β-lactamines
Imipénème	IMP	10µg	Carbapénèmes	
Aztréonam	ATM	5µg	Monobactames	
Ticarcilline	TIC	75µg	Carboxpenicilline	
Ticarcilline/ Acide clavulanique	TCC	85µg		
Pipéracilline	PIP	100µg	Urédopénicilline	
Tobramycine	TM	30µg	Aminosides	
Amikacine	AK	10µg		
Gentamicine	GM	10µg		
Ciprofloxacine	CIP	5µg		
Triméthoprimé/ Sulfaméthoxazole	SXT	25µg	Sulfamides	
Sulfamides	SSS	200µg		
Colistine	CS	50µg	Polymixines	
Fosfomycine	FOS	50µg	Fosfomycines	
Tetracycline	TE	30µg	Tetracyclines	

### *Annexe 3*

Nombre de colonies révertantes obtenu pour les témoins négatifs et témoins positifs du test d'Ames:

<b>Souches</b>	<b>Nombre de colonies révertantes (-S9)</b>
<b>Témoins négatifs :</b>	
<b>TA98</b>	<b>50 ± 10</b>
<b>TA100</b>	<b>215 ± 10</b>
<b>TA1535</b>	<b>20 ± 5</b>
<b>Témoins positifs :</b>	
<b>Sodium azide</b>	<b>1200 ± 20</b>
<b>4-Nitro-o-phenylenediamine (4-NQO)</b>	<b>1700 ± 20</b>

Un test est considéré comme positif s'il y a une réponse liée à la dose avec un nombre de colonies révertantes dépassant au moins deux fois le nombre obtenu pour le contrôle négatif.

- Pour toutes les souches d'essai avec une faible fréquence de mutants (nombre faible de mutants), par exemple la souche TA1535, une dose-réponse avec une multiplication par trois est considérée comme positive (**Pillco et Peña, 2014**).