

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE



Université Saad Dahleb -blida-

Faculté des sciences de la vie et de la nature.

Département de la Biologie

Option : Biochimie.

Mémoire de Master

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de master académique

**Repositionnement de médicaments pour lutter contre des
bactéries multirésistantes.**

Présenté et soutenu par : Mr Benbaibeche Walid & Mr KadaBillel.

Devant les jurys :

ARKAM F.

Présidente :

MCB

HAMAIDI F.

Examinatrice :

Professeur

TOBAL SEGHIR S.

Promotrice :

MAA

Promo : 2021-2022

Remerciements :

Nous aimerions en premier lieu remercier notre "Dieu" le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la volonté, la force, le courage et surtout la patience pour la réalisation de ce travail.

Nous avons terminé notre parcours et réalisé ce mémoire grâce aux efforts et le soutien de plusieurs personnes.

Premièrement, Nous adressons nos sincères remerciements pour notre promotrice madame Tobalsghir S. MAA, à l'USDB1, pour nous avoir guidés, conseillés et pour ces grands efforts pour donner notre mieux et finaliser notre travail.

Nous voudrions adresser nos remerciements à madame ARKAM F. MCB à l'USDB1, qui nous fait l'honneur de présider le jury et à madame HAMAIDI F. Professeur à l'USDB1, pour l'intérêt qu'elle a porté pour ce travail.

Nous voudrions remercier DR. LASSAS ET L'ASSISSTANTE AICHA, pour NOUS AVOIR donné l'opportunité de réaliser notre STAGE PRATIQUE. Ils ont été d'un grand soutien dans l'élaboration de ce mémoire.

Dedicace

A mes chers parents, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études.

A ma chère sœur Nadjiba et son mari Younes et leurs filles Sirine, Yasmine, Arwa pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral,

A mes chers frères, Abdelkarim et Zouhir, pour leur appui et leur encouragement.

*A mon pote et frère Billel pour ces années qu'on passé ensemble
A toute la famille Benbaibeche et Debbah pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire.*

A MES CHERS AMIS, Nouredine, Wail, Fares, Ayoub et Sid Ahmed, Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fruit de votre soutien infailible, Merci d'être toujours là pour moi.

Walid

Dédicace

À Dieu tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie, qui m'a donné la force, la santé et le Courage de réaliser ce précieux travail.

A mon cher père, les mots ne peuvent pas rendre ce que tu m'offrir, Ton soutien fut une lumière dans tout mon parcours. Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour l'estime et le respect que j'ai toujours eu pour toi. Merci infiniment

A ma mère, qui m'a entouré d'amour, d'affection et qui fait tout pour ma réussite, qui m'a supporté dans toutes mes moments de faiblesse avec ses prières et avec ces mots que dieu la garde

Pour ma sœur et mon frère, je vous dédie ce travail pour la joie et les sourires qui vous me donnent, je vous aime

Pour mon collègue et mon frère Walid, pour les beaux jours de nos vies, merci pour vos sacrifices

A Belahouelomar, vous étiez un des causes du succès de notre travail, par ton aide et vos conseils

Pour la famille KADA ET la famille BOUREGA.

A MES CHER AMIS, Hafid, hsene, amine et ahmedezahi

AU Doctorante Lina Belarouci, elle était toujours présente avec ses consignes et son aide toutes fois qu'on besoins. Merci infiniment.

La résistance bactérienne s'est largement propagée ces dernières années, les médicaments qu'on connaît deviennent de plus en plus inefficaces. Du fait que le développement de nouveaux antibiotiques rencontre de nombreux obstacles augmentant la probabilité d'échec, le repositionnement des médicaments représente une stratégie prometteuse pour lutter contre la propagation de la résistance bactérienne.

Cette étude s'appuie sur le repositionnement de médicaments génériques « non antibiotiques » qui n'ont pas d'effets secondaires graves afin d'inhiber la croissance de deux souches bactériennes multirésistantes (*Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli*) par deux méthodes : *in silico* et *in vitro*.

Cent neuf médicaments sont testés, *in silico*, contre quatre protéines bactériennes responsables de la résistance. L'amarrage moléculaire est réalisé à l'aide du logiciel **AUTODOCK VINA**. 36 principes actifs présentent une affinité élevée et pourront probablement interagir avec les protéines cibles. Dix médicaments génériques sont testés, *in vitro*, de façon empirique pour savoir s'ils possèdent des activités antibiotiques non reconnues contre les souches test. Les résultats présentent des taux d'inhibitions arrivant jusqu'à **88%** un peu moins du seuil retenu de 90%.

Mots clés :

Amarrage moléculaire, repositionnement de médicaments, bactéries multirésistantes.

حيث أن .انتشرت المقاومة البكتيرية بشكل واسع في السنوات الأخيرة، و الأدوية المعروفة لمحاربتها أصبحت غير فعالة انتاج أنواع جديدة من المضادات الحيوية يتعرض لعدد من العوائق الذي يزيد من نسبة الفشل، إعادة توظيف الأدوية استراتيجية واعدة لمحاربة انتشار المقاومة البكتيرية.تمثل

التي لا تمتلك الأضرار "ماعد المضادات الحيوية" هذه الدراسة تركز على إعادة توظيف الأدوية المستنسخة في سيليكو و في المخبر :الخطيرة لتثبيط نمو سلالتين بكتيرية متعددة المقاومة ب طريقتين.الجانبية الالتحام الجزيئي يطبق عن .مئة و تسعة دواء تم اختباره في السيليكو على أربع بروتينات بكتيرية مسؤولة على المقاومة عشر أدوية مستنسخة تم .موقع فعال نتائج تقارب مرتفعة و يمكنها تتفاعل مع البروتين الهدف 36أوضح.طريق برنامج التي تتم .استخدامها في المخبر بطريقة تجريبية لمعرفة ما إذا تمتلك وظائف مضادات حيوية لا نعرفها ضد السلالتين دراستهما

النتائج أوضحت نسب تثبيط تقارب الثمانية و الثمانون بالمئة بنسبة تقل بقليل على عتبة التثبيط المثالية تسعون بالمئة.

الكلماتالذالة

الالتحامالجزيئي،إعادةوضعالأدوية، مقاومة البكتيريا.

Bacterial resistance has spread widely in recent years, with known drugs becoming increasingly ineffective. Because the development of new antibiotics faces many obstacles that increase the likelihood of failure, drug repositioning represents a promising strategy to combat the spread of bacterial resistance.

This study is based on the repositioning of generic "non-antibiotic" drugs that do not have serious side effects to inhibit the growth of two multidrug-resistant bacterial strains (*Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*) by two methods: in silico and in vitro.

One hundred and nine drugs are tested, in silico, against four bacterial proteins responsible for the resistance. Molecular docking is performed using AUTODOCK VINA software. 36 actives ingredients have a high affinity and are likely to interact with the target proteins. Ten generic drugs are tested, in vitro, empirically for unrecognised antibiotic activity against the test strains. The results show inhibition rates of up to 88%, slightly below the selected threshold of 90%.

Key words:

Molecular docking, Drug repositioning, multidrug resistance.

Liste des abréviations :

AMM : autorisation de mise en marché.

ADN : Acide DésoxyriboNucléique.

ATB : Antibiotique.

CEDH : criblage moléculaire a haute débit.

EBLSE : Entérobactéries bêta-lactamase à spectre élargi.

MDR: Multi drug resistant.

NMDA:N-methyl-D-aspartate receptor.

PA : principe actif.

PBPs : penicillin binding proteins.

R&D : recherche et développement.

SSPT : Syndrome de Stress Post-Traumatique.

TSPT : trouble de stress post-traumatique.

XDR : extra drugresistant.

SARM : Staphylococcus aureus méticilline-résistant.

ERG : Enterococcus faecium glycopeptide-résistant.

PAR : Pseudomonas aeruginosa multi-résistante.

ECBU : L'examen cytbactériologique des urines.

RND : Résistante nodulation drogues.

CAMHB : bouillon muellerhinton ajusté en cations.

Liste des figures :

FIGURE 1 : UTILISATION D'ANTIBIOTIQUES ET APPARITION DE RESISTANCES BACTERIENNES (BEGAUD ET AL., 2010).	14
FIGURE 2 : PRINCIPAUX MECANISMES DE RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES. (PASCALE LESSEUR, 2019).	18
FIGURE 3 TELECHARGEMENT DE LA PROTEINE EX : 6NFD.	23
FIGURE 4 TELECHARGEMENT DU LIGAND EX: ACYCLOVIR.	23
FIGURE 5 CREATION DU DOSSIER SUR LE BUREAU.	24
FIGURE 6 CREATION D'UN AUTRE DOSSIER (LIGAND).	24
FIGURE 7 PREPARATION DE LA PROTEINE.	25
FIGURE 8 PREPARATION DE LA PROTEINE (SUITE).	25
FIGURE 9 ENREGISTREMENT DE LA PROTEINE PREPARE SOUS FORMAT PDB.	26
FIGURE 10 CONVERSION DU FORMAT DU LIGAND.	26
FIGURE 11 ENREGISTREMENT DU LIGAND PREPARE.	27
FIGURE 12 L'OUVERTURE DU LIGAND AVEC LA PROTEINE.	27
FIGURE 13 OBTENTION DES DONNEES DU SITE ACTIF.	28
FIGURE 14 DEPLACEMENT DE L'AUTO DOCK VINA DANS LE DOSSIER DU LIGAND.	28
FIGURE 15 DEFINITION DE L'EMPLACEMENT DU DOSSIER SUR LA COMMANDE.	29
FIGURE 16 RECUPERATION DES SCORES AFFINITES.	29
FIGURE 17 : PROTOCOLE DU CRIBLAGE DES MOLECULES MEDICAMENTEUSES.	32
FIGURE 18 : PROFIL DE RESISTANCE D'ESCHERICHIA COLI.	36
FIGURE 19 PROFIL DE RESISTANCE DU KLEBSIELLA PNEUMONIAE.	ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.
FIGURE 20:SCORE D'AFFINITE POUR LES PROTEINES CIBLES	38
FIGURE 21 : SCORE D'AFFINITE POUR LES PROTEINES CIBLES (SUITE).	39
FIGURE 22:SCORE D'AFFINITE POUR LES PROTEINES CIBLES (SUITE).	39
FIGURE 23 : SCORE D'AFFINITE POUR LES PROTEINES CIBLES (SUITE).	40
FIGURE 24 L'AMARRAGE MOLECULAIRE D'ACIDE NIFLUMIQUE ET CYPROHEPTADINE LA BETA LACTAMASE DE K.PNEUMONIAE.	41
FIGURE 25 L'AMARRAGE MOLECULAIRE DE DIAZEPAM ET DIHYDROERGOTAMINE ET LA BETA LACTAMASE K.PNEUMONIAE.	42
FIGURE 26 L'AMARRAGE MOLECULAIRE DE LA FLUBENDAZOLE ET CARBAZEPAMINE ET LA PROTEINE BETA LACTAMINE DE K.PNEUMONIAE.	42
FIGURE 27L'AMARRAGE MOLECULAIRE DE LA GLYBURIDE ET LA HALOPEDRIOL AVEC LA BETA LACTAMASE DE K.PNEUMONIAE.	43
FIGURE 28L'AMARRAGE MOLECULAIRE DE LA KETOCONAZOLE ET LA MIASERIN AVEC LA BETA LACTAMASE DE K.PNEUMONIAE.	44
FIGURE 29L'AMARRAGE MOLECULAIRE DE L'IRBESARTAN ET L'ITRACONAZOLE AVEC LA BETA LACTAMASE DE K.PNEUMONIAE.	44
FIGURE 30L'AMARRAGE MOLECULAIRE DE L'OLOPATADINE ET LA PAROXETIN AVEC LA BETA LACTAMASE DE K.PNEUMONIAE.	45
FIGURE 31L'AMARRAGE MOLECULAIRE DE LA DIHYDROERGOTAMINE ET BROMOCRIPTINE AVEC LA BETA LACTAMASE D'E.COLI.	46
FIGURE 32L'AMARRAGE MOLECULAIRE DE LE DIHYDROERGOTAMINE AVEC LA RND DE L'E.COLI.	47
FIGURE 33L'AMARRAGE MOLECULAIRE DE LA DESLORATADINE AVEC LA RND DE L'E.COLI.	47
FIGURE 34L'AMARRAGE MOLECULAIRE DE L'ITRACONAZOLE AVEC LA RND D'E.COLI.	48
FIGURE 35L'AMARRAGE MOLECULAIRE DE LA LORATADINE AVEC LA RND D'E.COLI.	48
FIGURE 36L'AMARRAGE MOLECULAIRE DE LA FEXOFENADINE AVEC LA RND D'E.COLI.	49
FIGURE 37L'AMARRAGE MOLECULAIRE DE L'ACIDE NIFLUMIQUE AVEC LA RND DE K.PNEUMONIAE.	50
FIGURE 38 L'AMARRAGE MOLECULAIRE DE LA DESLORATADINE AVEC LA RND K.PNEUMONIAE.	50
FIGURE 39L'AMARRAGE MOLECULAIRE DE L'ITRACONAZOLE AVEC LA RND DE K. PNEUMONIAE.	51
FIGURE 40L'AMARRAGE MOLECULAIRE DE LA KETOCONAZOLE AVEC LA RND DE K. PNEUMONIAE.	51
FIGURE 41L'AMARRAGE MOLECULAIRE DE LA LORATADINE AVEC LA RND DE K. PNEUMONIAE.	52
FIGURE 42L'AMARRAGE MOLECULAIRE DE LA BROMOCRIPTINE AVEC LA RND DE K. PNEUMONIAE.	52

<u>FIGURE 43</u> L'AMARRAGE MOLECULAIRE DE LA DIHYDROEGOTAMINE AVEC LA RND DE K. PNEUMONIAE.	<u>53</u>
<u>FIGURE 44</u> L'AMARRAGE MOLECULAIRE DE LA GLYBURIDE AVEC LA RND K. PNEUMONIAE.	<u>53</u>
<u>FIGURE 45</u> TAUX D'INHIBITIONS DE LA CROISSANCE BACTERIENNES.	<u>54</u>

Liste des tableaux

<u>TABLEAU 1</u> LES MEDICAMENTS CANDIDATS TESTES DANS LA PARTIE IN VITRO.	<u>20</u>
<u>TABLEAU 2</u> LES FAMILLES D'ANTIBIOTIQUES TESTES.	ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.
<u>TABLEAU 3</u> LES FAMILLES D'ATB TESTES.	ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.

1	Historique :	2
2	Les nouveaux médicaments (princeps) :	3
2.1	Les étapes de développement d'un médicament nouveau (princeps) :	3
2.1.1	Identification et validation des cibles thérapeutiques :	3
2.1.2	Identification des composés prometteurs (touches, hits) :	3
2.1.3	Mise au point et optimisation de têtes de série (leads) :	4
2.1.4	Les essais précliniques :	4
2.1.5	Tests de toxicologie :	4
2.1.6	Les essais cliniques :	6
2.1.7	Mise au point la forme galénique et sa production à grande échelle (phase d'industrialisation) :	7
2.1.8	Autorisation de mise sur le marché (AMM) :	7
2.1.9	La commercialisation :	7
3	La pharmacovigilance :	8
4	Les médicaments génériques :	8
4.1	Types de génériques :	9
4.1.1	Les génériques copie-copie ou intégraux.....	9
4.1.2	Les génériques essentiellement similaires ou équivalents	9
4.1.3	Les génériques "plus" ou assimilables	9
5	Le repositionnement des médicaments.....	10
5.1	Définition :	10
5.2	Exemples de repositionnement de médicaments :.....	10
5.2.1	La réutilisation de médicaments pour traiter les troubles d'apprentissage et de mémoire en neuropsychiatrie: (Sunjeev & Ravi, 2018)	10
5.2.2	Nouvel inhibiteur d'alpha-synuclein du parkinson :	11
5.2.3	Repositionnement de médicaments pour vaincre la résistance microbienne :... ..	12
5.2.4	Utilisation de molécules existantes dans le contexte de la pandémie du covid 19:	12
1	L'antibiorésistance :	14
2	L'histoire d'antibiorésistance :	14
3	Définitions de l'antibiorésistance :	15
3.1	Type de la résistance :	15
3.1.1	La résistance intrinsèque (Naturelle) :	15
3.1.2	La résistance acquise :	15

4	Mécanisme de l'antibiorésistance :	16
4.1.1	Diminution de la quantité d'antibiotique:	16
4.1.2	Perméabilité réduite :	16
4.1.3	Augmentation de l'efflux :	16
4.1.4	Modification de la cible de l'antibiotique (par mutation ou modification post-traductionnelle) :	17
4.1.5	Inactivation de l'antibiotique (par hydrolyse ou modification) :	18
5	Les bactéries multirésistantes :	18
5.1	Les EBLSE :	19
5.2	Les SARM :	19
5.3	Les ERG :	20
5.4	Les PAR :	20
1	Matériel :	20
1.1	Matériel biologique:	20
1.2	Matériel non biologique :	20
2	Méthodes :	21
2.1	Partie <i>in silico</i> : (Seeliger & de Groot, 2010).	21
2.1.1	Les étapes de l'amarrage moléculaire par Autodock Vina :	22
	• Copier l'URL du dossier créé et la commande dans l'invite commande.....	29
2.2	Partie <i>in vitro</i> :	30
2.2.1	Préparation des médicaments :	30
2.2.2	Vérification du profil de résistance des souches test :	30
2.2.3	Préparation des isolats et dilution des souches	31
2.2.4	Criblage empirique des médicaments candidats :	31
1	Mécanisme de résistance des deux souches :	36
2	Résultats de La prédiction <i>in silico</i> (amarragemoléculaire) :	38
2.1	Beta lactamase :	40
2.2	Les pompes d'efflux RND :	46
3	Taux d'inhibition bactérienne :	54
III.	Les références :	58



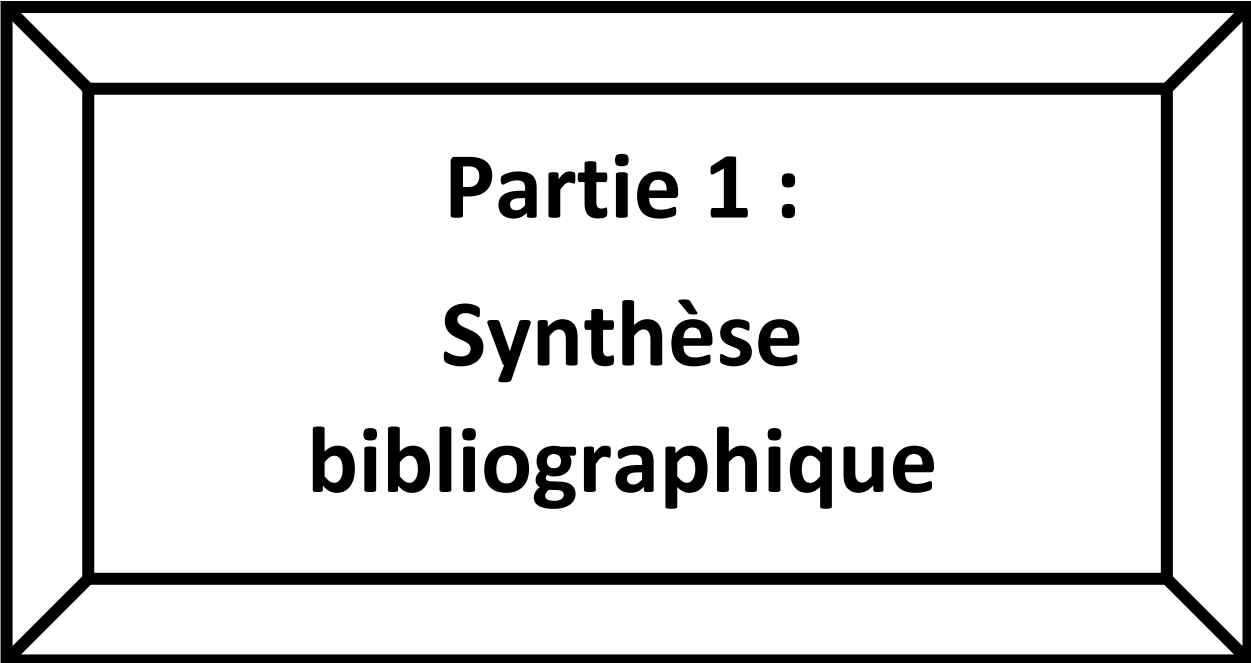
Introduction

Au 21^{ème} siècle, les infections graves causées par des microorganismes résistants aux antibiotiques couramment utilisés sont devenues un problème de santé majeur au niveau mondial. D'après l'OMS, la résistance aux antibiotiques est aujourd'hui l'une des plus graves menaces. Ceci est responsable de l'augmentation de la mortalité, d'hospitalisations plus longues et de l'augmentation des coûts des soins de santé (**Rai et al, 2013**).

La découverte et le développement de médicaments sont des activités coûteuses, chronophages et risquées. A titre d'exemple, le coût moyen de la mise sur le marché d'un nouveau médicament est estimé à **1,24 million** de dollars (**Hua et al, 2022**). Le repositionnement des médicaments devient une stratégie attirante pour la découverte de nouvelles activités thérapeutiques pour des médicaments déjà existants, par rapport à la conception ordinaire des molécules divisée en quatre étapes ; la découverte de la molécule, les essais précliniques, les essais cliniques et enfin la mise sur le marché. Ces étapes peuvent prendre jusqu'à 17 ans, cette nouvelle approche nous fait gagner du temps dans les cas des urgences, aussi elle est beaucoup moins onéreuse.

Ce concept a été déjà utilisé dans différents traitements et indications thérapeutiques tel que les maladies neurologiques, la lutte contre le cancer et contre les infections virales et microbiennes. L'utilisation incontrôlable des antibiotiques a favorisé la propagation de la résistance bactérienne, les B-lactamines et les quinolones faisant partie des familles d'antibiotique, elles sont les antibiotiques les plus connus et utilisées, de ce fait les bactéries ont adaptées et ont développée des mécanismes de résistance soit par la sécrétion des enzymes qui dégradent les ATB ou bien par d'autres mécanismes intracellulaires comme l'expulsion des antibiotiques en dehors de la bactérie.

Dans notre travail on a pensé à trouver des inhibiteurs de ces mécanismes par deux méthodes : une méthode *in silico* où on a ciblé deux protéines responsables de la résistance bactérienne et une méthode empirique *in vitro* en testant dix molécules médicamenteuses non antibiotiques contre deux souches bactériennes multirésistantes.



Partie 1 :
Synthèse
bibliographique

1 Historique :

Depuis les anciennes âges, l'homme a toujours essayé de trouver des remèdes permettant de guérir et de soulager les douleurs, tout en utilisant ce qu'ils disposaient ; plante, animaux, minéraux ...etc.

L'époque gréco-romaine a connu une vaste plantation du pavot afin d'utiliser l'opium pour supprimer les douleurs. La preuve écrite cela apparaît dans les tablettes sumériennes, les cylindres babyloniens et les hiéroglyphes égyptiens.

A partir du **9^{ème} siècle** les musulmans organisent la médication comme une profession, L'exercice de la profession de pharmacien impliqua donc une formation adéquate par des études spécialisées et ainsi naquit une certaine science pharmaceutique. La période avant le 9^{ème} siècle peut donc être considérée comme une période préscientifique.

Après que les musulmans avaient mis les premiers fondements pour une pharmacie "scientifique" on assiste pendant un millénaire au développement très lent de la pharmacie artisanale à la pharmacie moderne. Cette évolution de longue durée est caractérisée par l'absence d'un développement spectaculaire du médicament jusqu'à la fin du **19^{ème} siècle**. Pendant toute cette période le médicament fait partie inhérente à la pharmacie : il y est préparé, contrôlé, délivré et même inventé (**Neori, 2019**).

Le progrès des sciences exactes a engendré le développement des "sciences pharmaceutiques" et a conduit à la révolution industrielle pharmaceutique. Une partie du corps pharmaceutique, stimulée par les nouvelles possibilités de la chimie et de la physique, se mit à l'œuvre pour trouver des nouveaux médicaments. La recherche et la production de ces nouvelles molécules exigeaient l'emploi d'appareils et de méthodes qui dépassaient les moyens du laboratoire de l'officine. Paradoxalement, l'élite de la pharmacie enlève ainsi à la pharmacie une de ses bases fondamentales, la préparation des médicaments. L'évolution entamée à la fin du 19^{ème} siècle se poursuit durant tout le **20^{ème} siècle** et le pharmacien va perdre tout le terrain acquis en matière de préparation et d'analyse du médicament, sa fonction sera réduite à la délivrance du médicament. En même temps on assiste à l'évolution rapide des "sciences pharmaceutiques". La chimie pharmaceutique, science créatrice de nouveaux médicaments évolue vers la description et l'analyse. La conception de nouvelles molécules à activités physiologiques devient le domaine de la chimie médicinale.

Avec tout ce qu'on a aujourd'hui en terme matériels et savoir, la conception d'une nouvelle molécule médicamenteuse passe par plusieurs étapes délicates et peut prendre environ 15 ans pour avoir une autorisation de mise en marché (AMM) (Serreau, 2012).

2 Les nouveaux médicaments (princeps) :

La conception d'un nouveau médicament est un processus long et compliqué. Une seule molécule sur 10.000 molécules criblées, passera toutes les étapes de R&D jusqu'à sa mise sur les marchés. De plus, les frais de la recherche sont très chers pouvant arriver jusqu'au **800 millions d'euro** de cout moyen des investissements sans un résultat assuré (Serreau, 2012).

La recherche et le développement (R&D) des médicaments couvrent l'ensemble des étapes qui amènent la molécule choisie au stade du médicament autorisé et commercialisé. Les étapes de R&D s'étendent de l'isolement de la molécule jusqu'à la sortie du médicament sur deux volets essentiels : une phase « exploratoire » dont l'objectif est la découverte d'une molécule candidate, aboutissant à une « validation du concept » qui s'appuie sur des essais cliniques menés sur des patients, et une phase « confirmatoire » durant laquelle le médicament entre dans la phase de développement complet où des études sont réalisées sur un grand nombre de patients. Le processus de développement d'un médicament s'organise en plusieurs étapes, suivant un protocole rigoureux (Commissioner, 2020).

2.1 Les étapes de développement d'un médicament nouveau (princeps) :

2.1.1 Identification et validation des cibles thérapeutiques :

Généralement, la fabrication d'un médicament commence par l'identification d'une protéine associée à une maladie humaine. Ces protéines sont connues sous le nom de « cibles » dont l'activité peut être modulée par un principe actif afin de provoquer une activité thérapeutique agissant sur la pathologie étudiée. Aujourd'hui, génomique, proteomique, la recherche dans la littérature, les brevets, les bases de données, un nombre conséquent d'outils bio-informatiques et chémo-informatiques sur les cibles, la prédiction de site de fixation, permettent d'identifier des gènes ou protéines impliqués dans les maladies et susceptibles de devenir des cibles thérapeutiques (Serreau, 2012).

2.1.2 Identification des composés prometteurs (touches, hits) :

La cible étant validée, l'étape suivante consiste classiquement à tester l'action de dizaines de milliers, voire de millions de molécules, on parle alors de Criblage Expérimental à Haut Débit CEHD (HTS- High Throughput Screening), sur cette cible. Le CEHD automatisé permet de tester en parallèle par systèmes robotisés (un grand nombre de molécules sur une

cible biologique (extraits, cellules, organismes). Les molécules ainsi « cribles peuvent provenir de collections connues de la chimie traditionnelle ou sont issues de la chimie combinatoire ou isolées du monde vivant (végétaux, microorganismes terrestres ou marins...). Les « bibliothèques de molécules ainsi constituées varient de 1 000 à 970 000 000 composés. Quelques « touches » (hits) sortiront de ce tri. Environ 1% des molécules criblées démontre un niveau d'activité satisfaisant. Les compagnies pharmaceutiques peuvent avoir recours aux techniques de criblage virtuel en complément du criblage robotisé. Ces techniques *in silico* sont basées sur les connaissances accumulées à propos du système étudié et qui peuvent être la structure de ligands de référence "ligand-based drug design" ou la structure tridimensionnelle de la cible "structure-based drug design" (Krimm, 2015).

2.1.3 Mise au point et optimisation de têtes de série (leads) :

De façon générale, à partir d'un nombre important de molécules de départ, on effectue au moins trois filtrages successifs : le premier sert à identifier les touches, le second à sélectionner les têtes de série (lead, prototypes), enfin le troisième niveau de filtrage correspond à la sélection éventuelle, après optimisation des têtes de série, d'un ou plusieurs composés candidats au développement (EDC, early développement candidate) la dernière optimisation permet d'améliorer les propriétés de la molécule en terme d'activité, solubilité, absorption et éventuellement tolérance. Des études SAR (Structure Activity Relationship) sont effectuées au cours des deux dernières étapes de filtrage.

2.1.4 Les essais précliniques :

Le développement préclinique consiste à expérimenter ce candidat médicament sur l'animal (*in vivo*) et/ou à réaliser des cultures sur cellules (*in vitro*). Il est destiné à prouver son innocuité et son efficacité pharmacologique, il permet d'établir un premier profil de sécurité du médicament.

2.1.5 Tests de toxicologie :

Ils ont pour but d'une part de définir la limite de l'innocuité du produit, d'autre part les organes ou fonctions atteints lorsque la dose utilisée est toxique. Autrement dit, ces tests évaluent les risques d'effets secondaires des médicaments en développement

2.1.5.1 Étude de la toxicité aiguë :

Étude de la toxicité sur au moins 7 jours après une administration unique, sur au moins deux espèces de mammifères de souche connue, en utilisant au moins deux voies

d'administration différentes dont l'une identique à celle prévue chez l'humain. Elle doit aussi évaluer la DL 50 et établir les relations entre les doses utilisées et les effets obtenus.

2.1.5.2 Étude des toxicités subaiguë et chronique :

Elle a pour but de révéler les altérations fonctionnelles et/ou Anatomopathologiques apparaissant après administrations répétées de la substance étudiée, en établissant les conditions d'apparition de ces altérations (doses utilisées, rythmes d'administration). Elle comprend une épreuve à court terme (2 à 4 semaines) et une à long terme (3 à 6 mois ou plus en fonction de la durée envisagée pour le traitement chez l'humain) Elle doit être réalisée sur deux espèces de mammifères dont l'une différente des rongeurs.

2.1.5.3 Examen de la fonction reproductrice :

Il est effectué si les résultats des autres expérimentations font soupçonner des effets néfastes pour la descendance ou des altérations de la fécondité.

2.1.5.4 Étude de la toxicité embryofœtale et périnatale :

Son but est d'étudier les phénomènes toxiques éventuels en particulier tératogènes sur l'embryon quand le médicament potentiel est administré à la femelle gestante.

2.1.5.5 Étude pharmacodynamique :

Elle comporte de la pharmacologie générale (effet du médicament sur l'organisme), de la pharmacologie spécifique (effet sur un organe).

2.1.5.6 Étude pharmacocinétique et métabolisme du médicament :

Décrire le comportement et le devenir du composé dans un organisme vivant dont on distingue en général 4 phases ; Absorption, Distribution, Métabolisme et Elimination.

2.1.5.7 Étude du pouvoir mutagène :

Cette étude doit révéler les modifications héréditaires du matériel génétique d'individus ou de cellules occasionnés par l'administration du produit.

2.1.5.8 Étude du pouvoir cancérigène :

Celui-ci doit être recherché pour les produits qui présentent une analogie chimique avec des composés reconnus comme cancérigènes, ou qui ont provoqué des manifestations suspectes au cours de l'étude toxicologique à long terme ou au cours des tests de mutagenèse (Marion, 2014).

2.1.6 Les essais cliniques :

2.1.6.1 Phase 1 :

Le PA (principe actif) est testé sur des volontaires adultes sains avec une administration unique. L'objectif premier est d'évaluer la sécurité du produit et de déterminer l'échelle des doses tolérées. La phase I permettra aussi d'effectuer une première évaluation pharmacocinétique chez l'homme. Ici l'efficacité n'est pas un objectif. C'est une phase de tolérance. Les expériences de la phase I sont terminées avec succès lorsqu'on dispose d'informations suffisantes sur les effets indésirables en augmentant progressivement le dosage.

Le nombre total de participants en phase I se situe dans une fourchette de 20 à 80 personnes et cette expérimentation dure environ 6 à 18 mois. En principe 70 % des principes actifs passent avec succès cette première étape. Si le médicament se montre plus toxique que prévu, ou encore est mal toléré, les essais sont immédiatement arrêtés. Le composé est retiré du programme.

2.1.6.2 Phase 2 :

L'objectif principal des essais de cette phase est de déterminer la dose optimale (dose thérapeutique) du principe actif en termes d'efficacité et de tolérance (administration répétée). En pratique, il peut y avoir de 100 à 300 patients et la durée de cette phase est d'un à deux ans. En général, moins de la moitié des principes actifs entrant en phase II passe en phase III.

2.1.6.3 Phase 3 :

Ce sont les essais à grand échelle le nombre d'individus varie entre plusieurs centaines et plusieurs milliers de patients représentatifs de la population malades. Ce sont des essais comparatifs, il s'agit désormais de comparer le principe actif à d'autres médicaments prescrits dans la même indication ou à un placebo et d'évaluer le rapport bénéfice- risque du médicament dans l'indication ciblée. De **70 à 90%** des médicaments entrant en essai de phase III sont retenus comme candidats à une demande d'AMM.

Durant cette dernière étape, la forme galénique définitive est mise au point et les études d'efficacité thérapeutique seront complétées par celles nécessaires à la qualité pharmaceutique du produit (Cécile, 2018).

2.1.7 Mise au point la forme galénique et sa production à grande échelle (phase d'industrialisation) :

Parallèlement aux essais cliniques. L'industrie pharmaceutique étudie la phase dite d'industrialisation du candidat médicament parfaitement caractérisé sur le plan chimique et physico-chimique, sa forme pharmaceutique ainsi que son procédé de synthèse à grande échelle.

L'un des aspects centraux du développement pharmaceutique, qui accompagne la mise au point d'une méthode de production robuste et reproductible, est le développement des méthodes analytiques utilisées pour caractériser le produit et contrôler le respect des spécifications (Cécile, 2018).

2.1.8 Autorisation de mise sur le marché (AMM) :

Pour être commercialisée, une spécialité pharmaceutique doit obtenir préalablement une AMM. L'AMM est demandé par un laboratoire pharmaceutique, pour sa spécialité, sur la base d'un dossier déposé auprès de l'autorité compétente nationale comportant des données de qualité pharmaceutique, d'efficacité et de sécurité, dans l'indication revendiquée.

- La partie Qualité renseigne tous les aspects liés à la fabrication industrielle du médicament.
- La partie Sécurité compile les études conduites lors du développement préclinique,
- La partie Efficacité correspond à l'ensemble des résultats des études cliniques, menées sur l'homme.

Ces trois parties techniques sont accompagnées d'éléments d'aides à l'utilisation du médicament par les médecins et les patients que sont le Résumé des Caractéristiques du Produit (RCP), la notice patiente et les informations d'étiquetage (Cécile, 2018).

2.1.9 La commercialisation :

Le produit va vivre un cycle classique d'une durée comprise entre 10 et 15 ans et qui peut se décomposer en 5 phases :

La première phase est le lancement à ce stade les efforts marketings sont importants car il est nécessaire de communiquer avec l'innovation

La croissance c'est la deuxième étape, le nouveau médicament est largement accepté par la communauté médicale En concentrant les efforts marketing sur la promotion de sa propre marque, les ventes augmentent rapidement

Au stade de la « maturité », l'efficacité du produit est bien établie, les efforts marketings sont concentrés sur l'augmentation du volume d'acheteurs.

A l'avant dernière phase de « saturation, on cherche à maximiser les ventes. Le produit est ainsi utilisé pour toutes les indications trouvées, avec différentes formulations et à différents dosages.

Enfin, le « déclin » ou l'expiration du brevet du produit se traduit par une arrivée massive de **générique**, qui, combinée à l'apparition de nouveaux produits innovants entraînent un déclin des de ce dernier

3 La pharmacovigilance :

La mise en marche d'un médicament signifie qu'il est parfaitement sécurisé pour l'administration et l'utilisation thérapeutique, les médicaments commercialisés ont certainement passée par des tests cliniques et précliniques pour minimiser au maximum leurs dangerosité et sa toxicité (**Ankri, 1999**), mais cela n'élimine pas que certaines molécules sont toxiques malgré leurs fortes efficacités. Pas mal de médicament ont été retiré du marché (ex : rofecoxib, sibutramine, nimésulide, benfluorex ...etc) à cause de leurs effets indésirables intolérables. (**Montastruc et al., 2012**).

Après commercialisation, une surveillance appropriée est donc nécessaire pour identifier ce type d'effets et les groupes spécifiques de patients à risque, pour cela la pharmacovigilance a été développée depuis les années 60 après une affaire de thalidomide. L'évolution de la surveillance des médicaments invente toujours des nouvelles méthodes pour minimiser ces risques(**Montastruc et al., 2012**).

4 Les médicaments génériques :

Les médicaments génériques sont définis comme tout médicament prêt à l'emploi, autorisé par Swissmedic, dont la substance active, la forme galénique et le dosage sont interchangeables avec ceux de la préparation originale correspondante autorisée par Swissmedic", Autrement dit, le principe actif, soit celui qui détermine pour l'essentiel l'efficacité et la sécurité du médicament, doit être identique, tant dans sa composition que dans son dosage. La forme galénique doit être la même, de sorte qu'un sirop ne peut remplacer un comprimé à avaler, Les excipients (par exemple les sucres d'enrobage d'un comprimé) peuvent varier, car ils n'ont en principe aucune incidence sur l'efficacité et la sécurité du produit". La notice d'information dans les deux cas est sinon identique, du moins

semblable, Au demeurant, rien n'empêche un fabricant de génériques de copier en tous points le médicament original. Le générique peut être désigné par une appellation de fantaisie choisie par son fabricant (par ex. Voltaren) ou, plus simplement, par sa substance active (par ex. Diclofenac) (JUNOD, 2006).

Son principe actif n'est plus protégé par un brevet. Le détenteur d'un brevet dispose de l'exclusivité commerciale jusqu'à l'expiration du brevet et jusqu'à l'expiration de la durée de protection des données de l'AMM (10 ans en France). Lorsque les droits de propriété intellectuelle ont expiré, on dit que l'invention "tombe dans le domaine public". Dans ce cas, le médicament original peut être légalement copié. Le médicament générique s'identifie par le nom de DCI accompagné du nom du laboratoire ou par un nom de fantaisie. Une fois approuvé, le médicament est publié au journal officiel et inscrit au répertoire des spécialités génériques. Les génériques y sont regroupés par principe actif désigné par sa dénomination commune et par voie d'administration.

4.1 Types de génériques :

Trois catégories de génériques peuvent être distinguées en fonction du lien qui les relie au médicament de marque :

4.1.1 Les génériques copie-copie ou intégraux

Ce sont des copies exactes du princeps (même molécule, même quantité de principe actif, même forme galénique, même excipient et, souvent, même fabricant).

4.1.2 Les génériques essentiellement similaires ou équivalents

Possèdent la même quantité et qualité de principe actif, la même forme galénique mais les excipients changent.

4.1.3 Les génériques "plus" ou assimilables

Apportent une amélioration à la thérapeutique par une forme galénique différente (comprimé au lieu de gélule), la forme chimique du principe actif change (sel au lieu de base), la bioéquivalence de ces génériques doit également être prouvée par rapport au médicament original (Etienne, 2007).

5 Le repositionnement des médicaments

5.1 Définition :

C'est le processus de trouver ou développer une nouvelle activité thérapeutique pour une molécule déjà existante, qui a d'autre indication thérapeutique connue (**Langedijk et al., 2015**).

Depuis la pandémie de sars-cov2, les chercheurs ont été obligés de trouver un traitement le plus rapidement possible, mais cela ne peut pas être atteint si ils ont suivi le protocole de la conception des nouvelles molécules, cependant les chercheurs ont pensé à utiliser cette approche de l'utilisation des médicaments candidats déjà existants (**Ngan et al., 2022**).

La réorientation des médicaments consiste à tester un médicament pour une maladie autre que celle pour laquelle il a été initialement développé. La stratégie consiste donc à trouver de nouvelles indications thérapeutiques, soit des médicaments arrêtés faute d'efficacité mais dont on sait qu'ils sont inoffensifs, soit des médicaments déjà homologués pour traiter une maladie.

Les scientifiques ont observé qu'une molécule avait souvent plus d'une cible cellulaire dans le corps humain. C'est pourquoi des effets secondaires indésirables se produisent souvent suite à chaque traitement. Ainsi, des molécules évaluées pour une maladie donnée peuvent être efficaces pour traiter une autre maladie. Cette stratégie très intéressante présente de nombreux avantages. Repositionner un médicament permet de :

- Réduit considérablement le temps de développement. La première phase de l'évaluation de la toxicité et de la tolérabilité pour l'homme étant déjà réalisée et n'a donc pas besoin d'être répétée.
- Réduire considérablement les coûts des essais cliniques.

5.2 Exemples de repositionnement de médicaments :

5.2.1 La réutilisation de médicaments pour traiter les troubles d'apprentissage et de mémoire en neuropsychiatrie: (**Sunjeev & Ravi, 2018**)

Dans les pays à revenu élevé, comme le Royaume-Uni, les problèmes de santé mentale sont parmi les conditions médicales les plus courantes. Ces conditions peuvent avoir un impact dévastateur sur la population ; par exemple, l'empoisonnement accidentel dû à la dépendance aux **opioïdes** est l'une des principales causes de décès chez les jeunes adultes aux

États-Unis. Les processus neurobiologiques et psychologiques de base qui sous-tendent les troubles psychiatriques commencent seulement à être découverts. Les troubles sont considérés comme une « cible mouvante » : de nombreux symptômes distincts se manifestent différemment selon les personnes.

Des médicaments comme **le Propranolol** (un anti-hypertensives) et **l'Hydrocortisone** (un anti-inflammatoire), peuvent également altérer certains types d'apprentissage et de mémoire. Cela peut sembler surprenant au départ, car les troubles cognitifs aigus ne sont pas un effet secondaire couramment rapporté de ces médicaments, du moins chez les personnes sans maladies systémiques. En fait, leurs effets altérant la mémoire ne semblent se produire que dans des circonstances spécifiques et limitées dans le temps. En particulier, l'amnésie de certains types d'informations (émotionnelles) est évidente si le Propranolol ou l'Hydrocortisone sont administrés dans une brève fenêtre d'opportunité, lorsque la mémoire n'est pas encore complètement stabilisée ou « consolidée ». La consolidation de la mémoire - un processus qui se déroule sur plusieurs heures après l'apprentissage initial est entraîné par une synthèse protéique synaptique intense et une modification post-traductionnelle, conduisant au remodelage des synapses et à une "cimentation" des souvenirs dans un stockage à long terme.

Les chercheurs pensent que les antagonistes des récepteurs β -adrénergiques et des corticostéroïdes empêchent ces changements structurels et fonctionnels au niveau des synapses dans les régions cérébrales impliquées dans le traitement de l'information émotionnelle. Par conséquent, ces médicaments empêchent la formation de souvenirs.

5.2.2 Nouvel inhibiteur d'alpha-synuclein du parkinson :

La maladie du parkinson est une maladie neurogénérative, l'accumulation des molécules insolubles appelé Lewy bodies (forme sphérique) autour des cellules nerveuses qui se remplit avec l'agrégation de la protéine **alpha synuclein**.

Une nouvelle méthode '*in silico*' a été utilisée pour trouver un ligand qui a une affinité pour un modèle pharmacophore, ce modèle est pour l'inhibition de la fibrillation de alpha synuclein, cette nouvelle stratégie de recherche est une prédiction informatisée pour tester l'affinité de plusieurs ligands à partir de différentes bases de données.

L'amarrage moléculaire est réalisé par des applications trouvées gratuitement sur internet. (Jafaripour *et al.*, 2020).

5.2.3 Repositionnement de médicaments pour vaincre la résistance microbienne :

Beaucoup d'essais ont révélé que certaines molécules non antibiotiques possèdent réellement des activités antibactériennes.

- L'ibuprofène (anti-inflammatoire non stéroïdien) interagit avec des protéines bactériennes responsables du métabolisme et inhibe la synthèse des protéines.
- Le Naproxène (anti-inflammatoire) cause des dommages sur la paroi bactérienne et inhibe sa réparation.
- L'omeprazole (inhibiteur de la pompe H⁺/K⁺), il affecte les pompes d'efflux, essentielles pour le mécanisme de résistance aux quinolones (**Jampilek, 2022**).

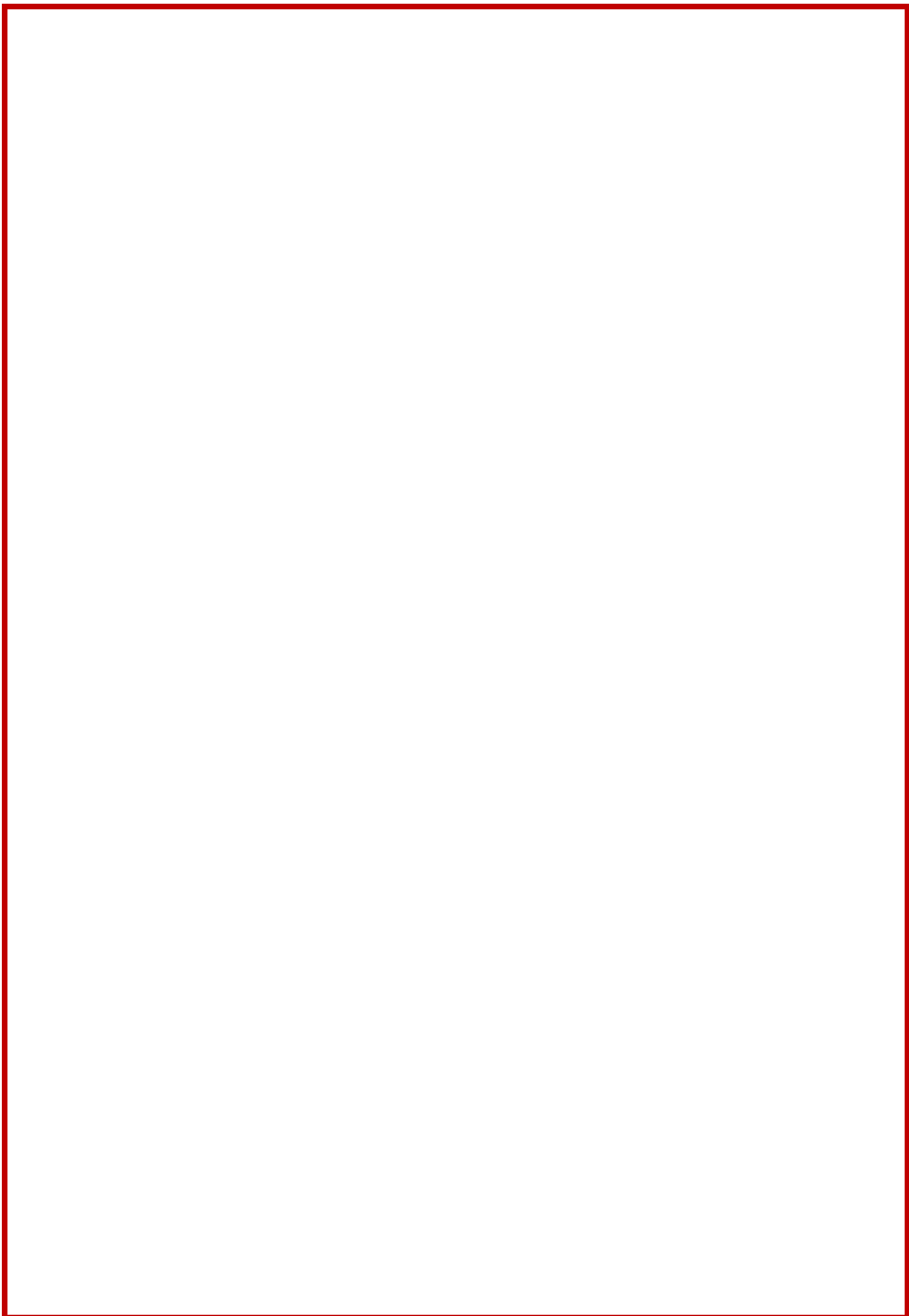
5.2.4 Utilisation de molécules existantes dans le contexte de la pandémie du covid 19 :

La situation d'urgence vécue durant la période de la pandémie causée par le SARS-CoV-2 a poussé les chercheurs à trouver une cure le plus rapidement possible. Cependant, la conception d'une nouvelle molécule n'est pas aussi facile.

L'utilisation des médicaments déjà existants était une solution raisonnable. **Treize** molécules repositionnées utilisées seules ou en association avec d'autres molécules ont marqué une efficacité. On peut citer entre autres :

- **Le Lopinavir** (un analogue de nucléoside) et le Ritonavir (un inhibiteur de protéase) utilisés en association ils bloquent la papain-like protease et la 3-chymotrypsin-like protéase chez le SARS-CoV-2.
- **Le Remdesivir** (antiviral/ adenosine triphosphate nucleoside analogue) ce médicament bloque la réplication d'ARN, plusieurs centres en USA l'utilisent comme un traitement contre la covid-19.
- **L'Amantadine** (un inhibiteur des canaux ioniques) ; l'étude *in vitro* réalisée par **Fink et ses collaborateurs (2020)**, a montré que l'Amantadine inhibe la réplication du SARS-CoV-2.

Dix autres molécules ont prouvé une efficacité face au SARS-COV-2 (**Punekar et al., 2022**).



1 L'antibiorésistance :

L'OMS a reconnu que l'antibiorésistance représentait une menace majeure internationale pour la santé publique et que son développement pourrait changer considérablement la prise en charge des maladies infectieuses dans les années à venir (OMS, 2020).

Les bactéries ont un grand pouvoir d'adaptation qui leur permet d'acquérir de nouvelles propriétés (modification de leur génome ou information génétique nouvelle) leur permettant de résister aux antibiotiques.

2 L'histoire d'antibiorésistance :

Au 20^{ème} siècle, la découverte a constitué un progrès majeur dans la médecine et le traitement des maladies bactériennes. Ils ont permis de soigner de nombreuses maladies mortelles et augmenter l'espérance de vie (Mollet, 2017).

L'apparition de cette résistance est due à l'utilisation massive et abusive des antibiotiques chez l'être humain et les animaux. Un point qu'Alexander Fleming a sanctionné dans sa conférence d'acceptation du prix Nobel (MULLER, 2017).

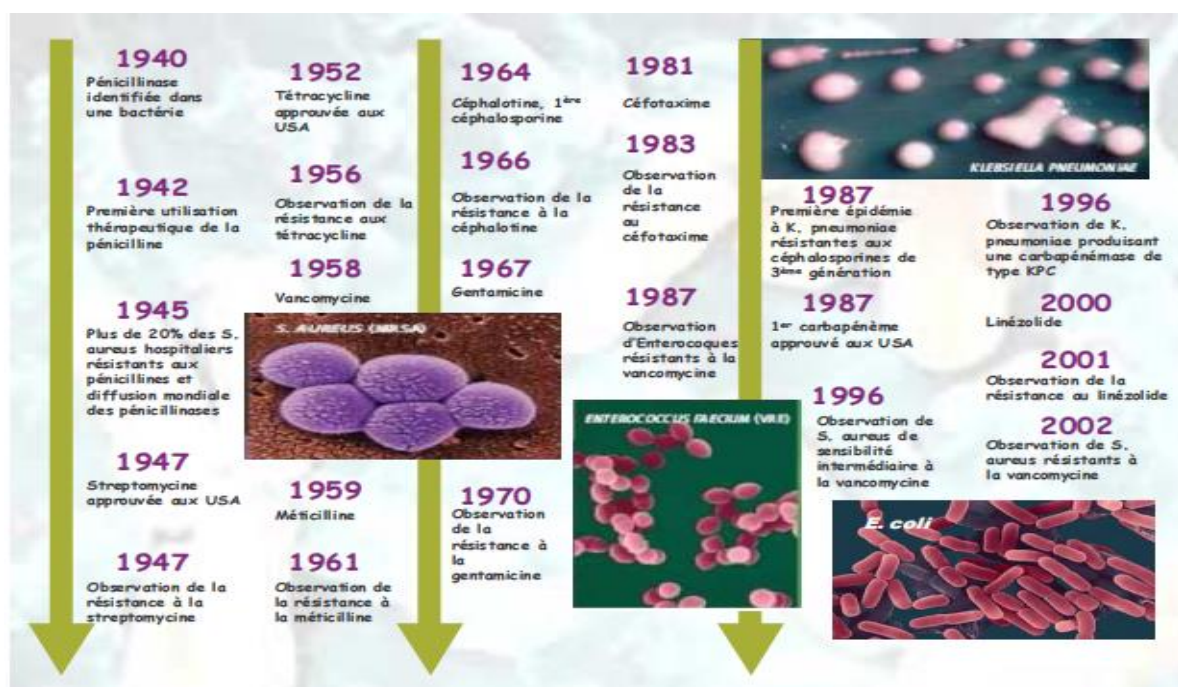


Figure 1 : Utilisation d'antibiotiques et apparition de résistances bactériennes (Begaud et al., 2010).

3 Définitions de l'antibiorésistance :

Dans la littérature, On peut trouver une définition clinique ou microbiologique de la résistance bactérienne.

La résistance bactérienne est le potentiel des bactéries à se multiplier *in vitro*, c'est-à-dire à des concentrations d'antibiotiques supérieures à celles qui inhibent normalement la croissance des bactéries de la même espèce.

La résistance clinique est définie comme l'évolution clinique défavorable de l'infection sous traitement antibiotique, Cette résistance est complexe car elle dépend de l'état de l'immunité du patient et implique une interaction entre les bactéries.

3.1 Type de la résistance :

La résistance aux antibiotiques peut être intrinsèque ou acquise via des mutations dans des gènes chromosomiques ou par un transfert de gène horizontal (**Mollet, 2017**).

3.1.1 La résistance intrinsèque (Naturelle) :

Ce type de résistance existe chez toutes les bactéries résistantes, elle occupe un seul antibiotique comme la résistance de *K. Pneumoniae* à la pénicilline par production de bêta lactamase de classe A, Cette résistance est stable et transmise à l'aide du chromosome d'une façon descendante.

Le mécanisme de résistance naturelle peut être contourné en élargissant le spectre d'antibiotique. (**Mollet, 2017**).

3.1.2 La résistance acquise :

Peut être définie comme l'apparition subite d'une résistance chez une bactérie sensible contre un ou plusieurs antibiotiques. Ce type de résistance résulte soit d'une mutation soit d'un transfert de gènes.

L'acquisition d'une résistance par mutation peut créer une résistance à un antibiotique voire une famille d'antibiotiques au plus. Cependant, Dans le cas d'acquisition des gènes de résistance, on peut observer une résistance à plusieurs antibiotiques, voire plusieurs familles d'antibiotiques.

Si une souche bactérienne accumule plusieurs mutations et transfert des gènes résistants on parle d'une bactérie multi-résistante BMR (**Mollet, 2017**).

4 Mécanisme de l'antibiorésistance :

Lors d'une résistance bactérienne, Les traitements antimicrobiens deviennent inefficaces, les infections persistent et peuvent se propager, Ces traitements vont exercer une pression de sélection sur les bactéries. Ces dernières s'adaptent ou meurent. D'autre part, Les bactéries résistantes portent des gènes de résistances aux médicaments qui peuvent être transférés à d'autres souches de leur genre et de leur espèce.

Les mécanismes principaux de la résistance acquise sont :

- Réduction de la concentration intracellulaire d'antibiotique « soit par mauvaise pénétration ou exportation par les pompes à efflux ».
- Mutation génétique ou modification post-traductionnelle.
- Inactivation d'antibiotique par hydrolyse ou modification (**marrie, 2019**).

4.1.1 Diminution de la quantité d'antibiotique:

Cette opération est effectuée en deux méthodes soit :

4.1.2 Perméabilité réduite :

Cette méthode est contrôlée par la régulation négative des porines ou des canaux plus sélectifs. Elle est favorisée par les BGN car leur membrane externe forme une barrière de perméabilité supplémentaire (**Mollet, 2017**).

4.1.3 Augmentation de l'efflux :

Cette méthode repose sur des transporteurs membranaires dite pompes d'efflux, Les transporteurs bactériens appartiennent à cinq superfamilles classées en deux types différents en fonction de leurs mécanismes d'action. Le type 1 des transporteurs primaires assurent l'expulsion d'antibiotique à l'aide de l'hydrolyse d'ATP : ce sont les transporteurs ABC (ATP-Binding Cassette). Le type 2 comprend des transporteurs secondaires associé par des gradients électrochimiques transmembranaires.

Le rôle des pompes d'efflux est de contribuer de façon importante dans la résistance intrinsèque, Parfois ces pompes incluent dans la spécificité pour un substrat et pour la plupart de temps dans le transport d'une large gamme des molécules structurellement différentes (Pompes MDR : pompe d'efflux Multi DRogue). La diffusion de mécanismes de résistance à d'autres agents pathogènes revient aux bactéries qui portent les gènes de résistance sur le plasmide. La famille Résistance-Nodulation Division (RND) des pompes d'efflux MDR est spécifique des bactéries Gram négatives. Leur surexpression engendre des niveaux de

résistance encore plus importante par exportation d'une gamme extrêmement large de substrats.

La conception de nouveaux produits thérapeutiques pour prévenir la production de pompe à efflux est passée par la compréhension approfondie du mécanisme de la surexpression des MDR. La transcription des gènes des pompes d'efflux est contrôlée par des régulateurs locaux, leurs gènes situés aux côtés des gènes des pompes et des régulateurs globaux. L'Accrue de transcription de ces facteurs supporte une augmentation de l'expression des pompes d'efflux et la répression des porines donc une résistance multi drogues assurée.

Les mutations peuvent se situer dans un répresseur local, un facteur de transcription global ou des sites inter géniques qui modifient l'expression des gènes de la pompe ou de leurs régulateurs qui va subir une surexpression constitutive de la pompe à efflux et une résistance à plusieurs médicaments. Par contre, l'augmentation de l'expression des pompes a lieu en raison de l'induction en réponse aux signaux environnementaux et dans les conditions dans lesquelles leur fonction est requise. Le mécanisme le plus commun d'induction de l'expression du gène de la pompe d'efflux est la liaison directe d'une molécule à une protéine répressive transcriptionnelle (Mollet, 2017).

4.1.4 Modification de la cible de l'antibiotique (par mutation ou modification post-traductionnelle) :

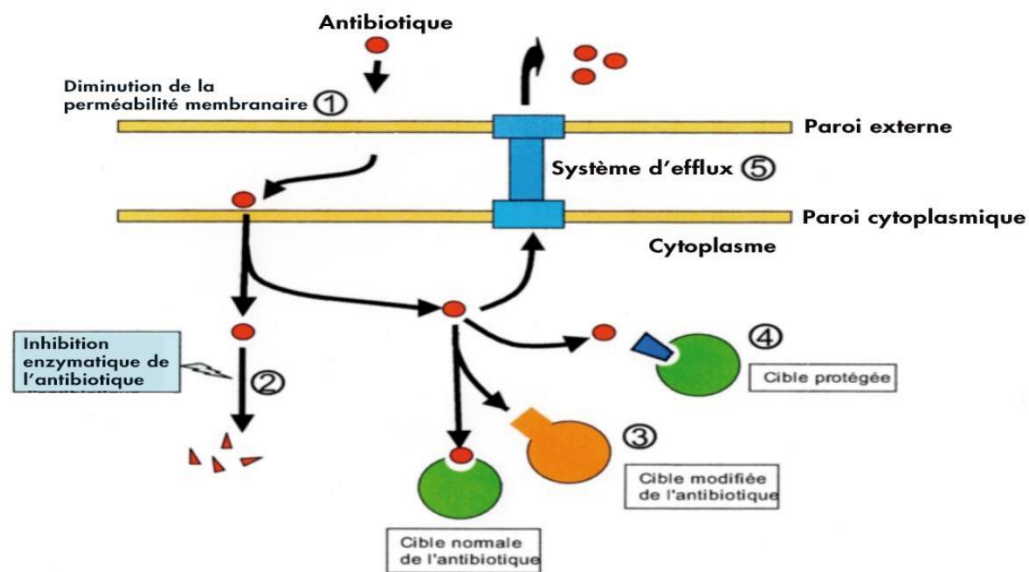
Dans l'état normal, La formation du complexe antibiotique-cibles aura lieu avec une grande affinité. Mais l'empêchement de cette association a lieu grâce aux modifications apportés sur la cible sans toucher leur fonctionnement naturel, c'est une résistance effectuer par une mutation ponctuelle au cours d'une infection dans le gène codant pour la cible qui empêche l'accès au site de fixation, Les gènes responsables de ces altérations sont souvent portés sur des plasmides permettant leur large diffusion comme le cas d'Aminoglycosides avec le ribosome, Les aminoglycosides sont des inhibiteurs de la synthèse des protéines qui agissent en se liant aux ribosomes. L'un des mécanismes de résistance à ces antibiotiques est la modification des ribosomes cibles par méthylation.

La cible alternative est aussi une protection pour la bactérie (ex : un enzyme qui va être la cible de l'antibiotique). Ce dernier laisse la bactérie produire sa protéine sensible originale (Veysiere, 2019).

4.1.5 Inactivation de l'antibiotique (par hydrolyse ou modification) :

Certaines bactéries ont une autre méthode de résistance aux antibiotiques par la dégradation ou la modification de l'antibiotique, La β lactamase clive la pénicilline et la rend inactive. Il y a des milliers de cas d'enzymes qui dégradent ou modifient différentes classes d'antibiotiques et il existe même qui dégradent différents antibiotiques de la même famille (Mollet, 2017).

L'antibiotique peut également être inactivé suite à un transfert d'un groupement chimique. Celui-ci par l'encombrement stérique empêche la liaison avec la protéine cible (après l'ajout de ces groupements sur des sites vulnérables de l'antibiotique par des enzymes bactériennes) (Veysièrre, 2019).



- (1) Diminution de la pénétration de l'antibiotique dans la bactérie.
- (2) L'antibiotique peut être inactivé par l'action d'une enzyme.
- (3) La modification de la cible empêche la fixation de l'antibiotique.
- (4) La protection de la cible empêche la fixation de l'antibiotique.
- (5) Les systèmes d'efflux provoquent une élimination de l'antibiotique hors de la cellule.

Figure 2 : Principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques.(Pascale Lesseur, 2019).

5 Les bactéries multirésistantes :

Les BMR sont des bactéries plus sensibles à quelques antibiotiques seulement, expliquant que toutes les bactéries peuvent développer une multirésistance due à l'accumulation de résistances acquises à plusieurs familles d'antibiotiques, qu'elles soient impliquées dans une infection communautaire ou une infection nosocomiale.

- MDR « multirésistant aux médicaments » : résistance à un antibiotique ou plus dans au moins trois familles différentes d'antibiotiques.
- XDR « très résistant aux médicaments » : sensibilité conservée uniquement pour une ou deux classes d'antibiotiques.
- PDR « résistant total aux médicaments » : résistance à tous les antibiotiques.

Les BMR les plus couramment détectés en microbiologie sont les Entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu, *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline, *Enterococcus faecium* résistant aux glycopeptides et le *Pseudomonas aeruginosa* (Veyssiere, 2019).

5.1 Les EBLSE :

Les EBLSE sont des BGN, aérobies ou anaérobies facultatifs, mobiles avec une mobilité péritriché ou immobiles, n'a aucune action d'oxydation. Par contre réduisent les nitrates en nitrites et fermentant de glucose. Dans la pratique clinique les espèces les plus couramment rencontrées sont *Escherichia coli* et *Klebsiella spp.*

Les entérobactéries ont la capacité de produire des enzymes (les bêta-lactamases) qui inactivent les bêtalactamines par ouverture du cycle bêta-lactame. Cette enzyme peut se propager rapidement et facilement à d'autres BGN, y compris *E. coli*. Leur impact est dramatique, notamment dans les services de réanimation. Les EBLSE sont dérivés des spectres TEM-1 et SHV-1. Pour l'instant, Il existe 90 types de bêta-lactamases TEM et 25 types de bêta-lactamases SHV (marrie, 2019).

5.2 Les SARM :

Staphylococcus aureus est une bactérie commensale ubiquitaire qui colonise la peau (au niveau des zones humides et des mains) et des muqueuses. C'est un agent pathogène puissant capable de développer une résistance à chaque nouvel antibiotique introduit. La plasticité de son génome lui permet de s'adapter à la plupart des conditions environnementales, d'acquérir des gènes de résistance aux antibiotiques et de développer des mécanismes de régulation pour s'adapter à des concentrations croissantes d'antibiotiques. Ainsi sont apparus les *Staphylocoques* résistants à la pénicilline. Plus tard, l'avènement de la méthicilline (pénicilline M), un dérivé semi-synthétique de la pénicilline pour le traitement des infections staphylococciques, a suscité des attentes. Mais à peine un an plus tard, les premières souches

hospitalières de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) sont apparues. Cette résistance a ensuite été attribuée au gène *mecA* qui confère une résistance à toute la famille des β -lactamines (Veysserie, 2019).

5.3 Les ERG :

Enterococcus faecalis est résistant aux glycopeptides. Au cours des 5 dernières années, plusieurs épidémies de colonisation gastro-intestinale ont été rapportées dans des établissements médicaux français dans lesquels les entérocoques sont résistants aux glycopeptides ; heureusement, ces souches provoquent rarement de véritables infections. En modifiant l'acide aminé sur le dipeptide terminal ciblé de D-alanyl-D-alanyl en D-alanyl-D-lactate, le gène *van* qui entraînera la modification de la cible antibiotique est obtenu (marrie,2019).

5.4 Les PAR :

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie à Gram négatif non fermentaire, mobile aérobie stricte, non capsulée, oxydase positive. C'est une bactérie ubiquitaire qui se développe dans les sols, les marais et les habitats marins côtiers, ainsi que sur les tissus végétaux et animaux.

Il est naturellement résistant à de nombreux antibiotiques par la faible perméabilité pariétale grâce à son affiliation au BGN, L'inactivation enzymatique et les systèmes de pompes à efflux sont actifs (marrie, 2019).



Partie 2 :
Matériel et Méthodes

1 Matériel :

1.1 Matériel biologique:

- La souche test : *Escherichia coli* été isolé à partir d'un prélèvement urinaire provenant d'un patient sondé âgé de 47 ans, hospitalisé au niveau de l'EPH Boufarik.
- La souche test : *Klebsiella pneumoniae* a été isolé d'un prélèvement pour ECBU provenant d'un enfant hospitalisé au niveau de l'EPH Boufarik.

1.2 Matériel non biologique :

- Matériel habituellement trouvé dans un laboratoire de microbiologie.
- 10 médicaments candidats n'ayant pas une activité antibiotique reconnue et appartenant aux différentes classes thérapeutiques représentés dans le tableau n°1 ont été utilisés dans la partie *in vitro*.

Tableau 1 Les médicaments candidats testés dans la partie in vitro.

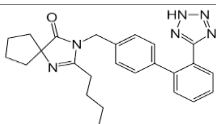
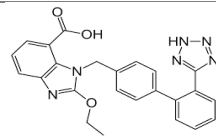
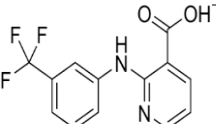
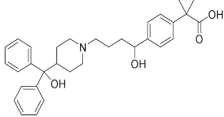
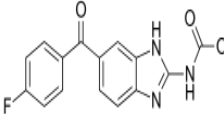
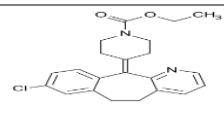
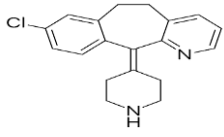
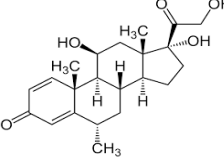
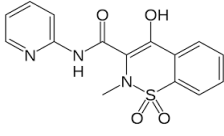
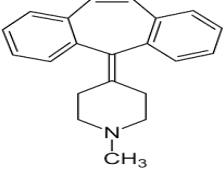
Médicament	Structure	Classe thérapeutique	Leur indication
Irbesartan		Antagoniste de récepteur de l'angiotensine II.	Traitement de l'hypertension artérielle et pour fonctionnement de reins chez les patients atteints de diabète type 2.
Candesartan		Antagoniste de récepteur de l'angiotensine II.	Hypertension ; Insuffisance cardiaque.
Acide niflumique		Anti-inflammatoire non stéroïdien.	Rhumatismes ; arthroses ; tendinites superficielles et entorses et contusions en traumatologie bénigne.

Tableau 1 : Les médicaments candidats testés dans la partie *in vitro*. (Suite)

Fexofénadine		Antihistaminique Anti-H2 non sédatif.	Rhinite allergique et l'urticaire.
Flubendazole		Anti helminthe.	Eliminer les oxyures, les ascaris et un grand nombre de vers parasites de l'intestin.
Loratadine		Antihistaminique non sédatif.	Rhinite allergique et l'urticaire.
Desloratadine		Antihistaminique non sédatif.	Rhinite allergique et l'urticaire.
Méthylprednisolone		Anti-inflammatoire stéroïdien.	Traitement de la sclérose en plaques pour diminuer la durée et la gravité des poussées ; de la polyarthrite rhumatoïde.
Piroxicam		Anti-inflammatoire non stéroïdien.	Traitement de l'arthrose et de la polyarthrite rhumatoïde
Cyproheptadine chlorhydrate		Antihistaminique H1 sédatif.	Soulager les symptômes allergiques.

2 Méthodes :

2.1 Partiel *in silico*: (Seeliger & de Groot, 2010)

Cette partie nécessite trois logiciels qui sont :

- ✓ **AutodocksTools** ;
- ✓ **AutodocksVina** ;
- ✓ **PyMol**.

Ces trois programmes assurent l'amarrage moléculaire pour déduire l'affinité d'un ligand pour une protéine cible. Ils doivent être installés et prêts à fonctionner.

Avant de commencer l'amarrage moléculaire, on doit choisir la cible pour laquelle on va faire la prédiction d'affinités. Nous avons utilisé différentes protéines responsables de la

résistance bactérienne chez *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae*.

Protéines utilisées dans la partie *in silico* :

4zit : Les bactéries Gram-négatives telles que *E. coli* utilisent des pompes à efflux tripartites comme « AcrAB-TolC » pour expulser les antibiotiques et les composés nocifs. Une caractéristique clé du composant de transporteur de membrane interne AcrB est une petite étendue de résidus appelée boucle de porte / commutateur qui sépare les poches de liaison au substrat proximale et distale. Les substitutions d'acides aminés du cycle porte sont connues pour réduire la résistance aux antibiotiques conférée par AcrB (Ababou & Koronakis, 2016).

7cz9 : OqxB, une pompe à efflux RND (résistant nodule-division), est apparue comme un facteur contribuant à la résistance aux médicaments chez *Klebsiella pneumoniae*.

OqxB a subi un transfert de gène horizontal, il est maintenant présent dans d'autres pathogènes bactériens à Gram négatif, notamment *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* et *Salmonella spp*. Il contribue à la propagation de la multirésistance. Nous avons utilisé cette structure dans des études informatiques pour prédire les médicaments qui peuvent bloquer l'OqxB, les caractéristiques structurales d'OqxB sont effectivement impliquées dans l'efflux de ciprofloxacine (Bharatham et al., 2021).

La beta lactamase : La famille CTX-M des bêta-lactamase médie la résistance aux antibiotiques à large spectre, elle est présente dans la majorité des infections bactériennes à Gram négatif résistantes aux médicaments dans le monde. Les codes de protéines beta lactamase sont « 5kmu » pour *E.coli* et « 6nfd » pour *K.pneumoniae*.

2.1.1 Les étapes de l'amarrage moléculaire par Autodock Vina :

2.1.1.1 Téléchargement des trois programmes gratuitement sur « Google ».

2.1.1.2 Téléchargement des protéines et des ligands :

- Télécharger les protéines à partir du PDB (Protein Data Bank). Le fichier du téléchargement doit être sous format (.pdbqt).

- Le télécharger la structure 3D des ligands à partir de PubChem, sous format (.sdf)

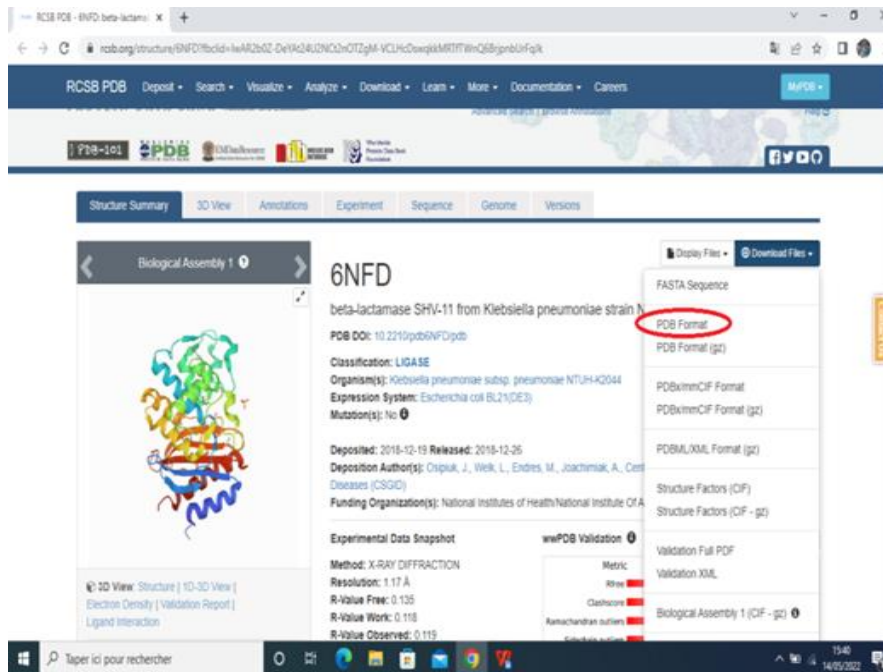


Figure 3 Téléchargement de la protéine ex : 6NFD.

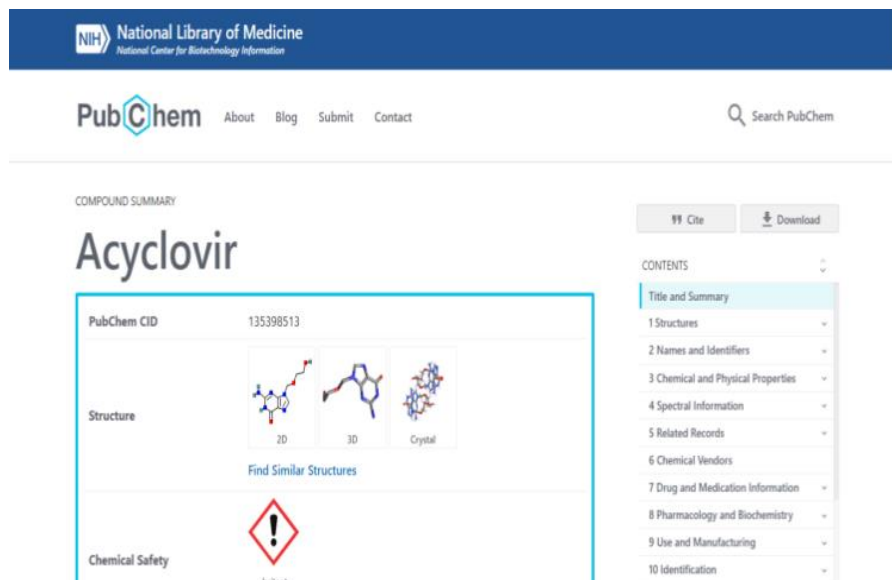


Figure 4 Téléchargement du ligandex: acyclovir.

2.1.1.3 Préparation du ligand et de la protéine :

2.1.1.3.1 Création des dossiers

- En premier lieu, On crée un dossier dans le bureau sous le nom de la protéine (6nfd).

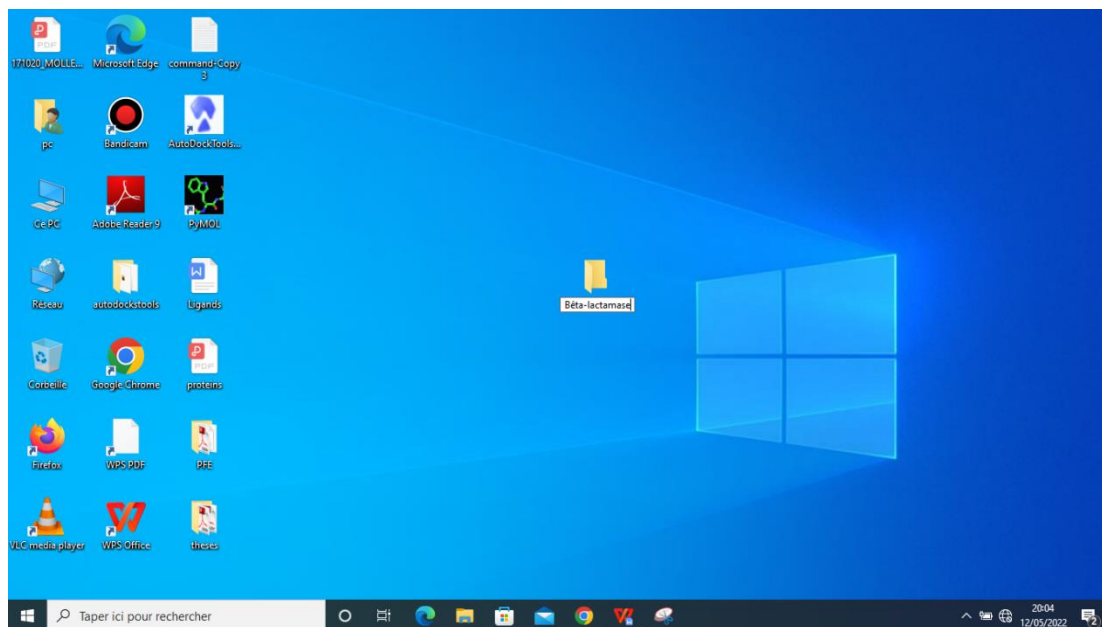


Figure 5 Création du dossier sur le bureau.

- Créer un nouveau dossier, dans le précédent, sous le nom du ligand.

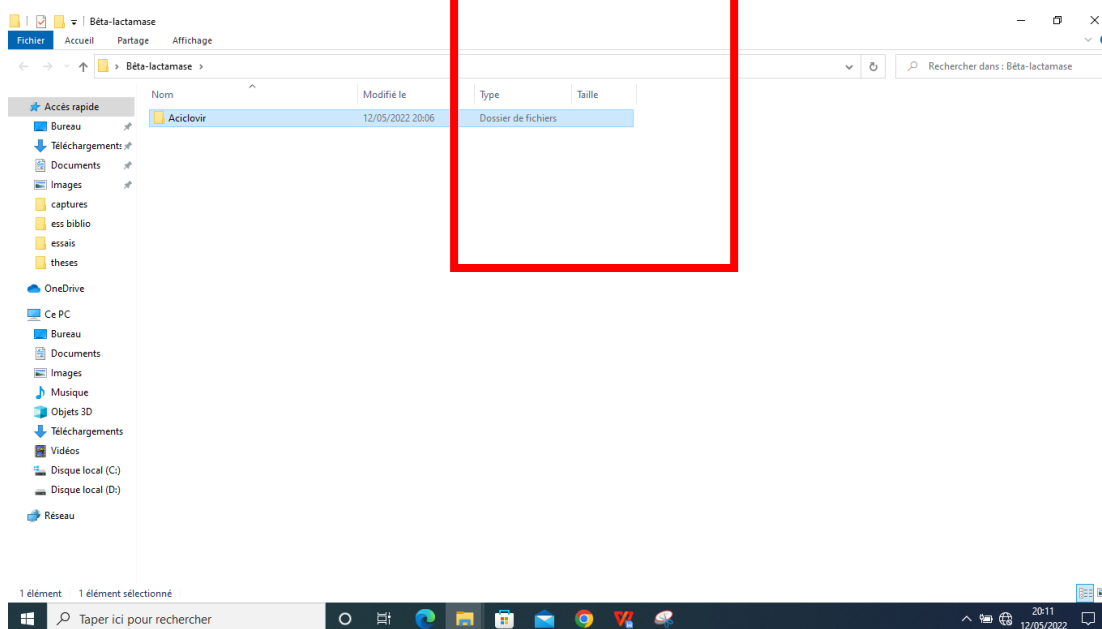


Figure 6 Création d'un autre dossier (ligand).

2.1.1.4 Préparation des protéines :

- Ouvrir la protéine téléchargée dans AUTODOCKSTOOLS.
- Éliminer les molécules d'eaux et ajouter les charges KOLLMAN.

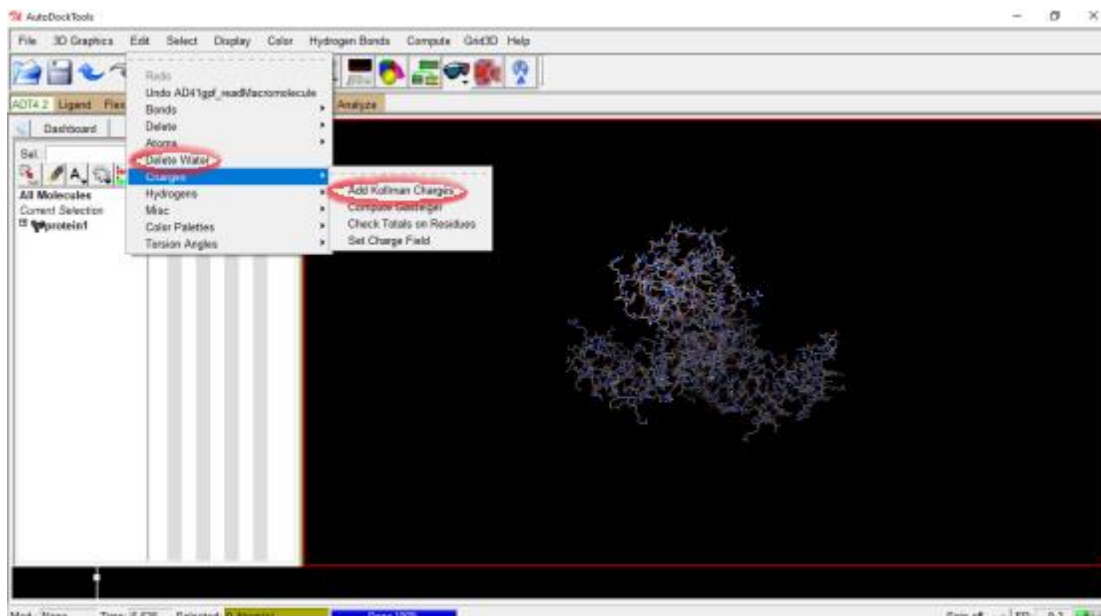


Figure 7 Préparation de la protéine.

- Ajouter les molécules d'hydrogènes polaires.

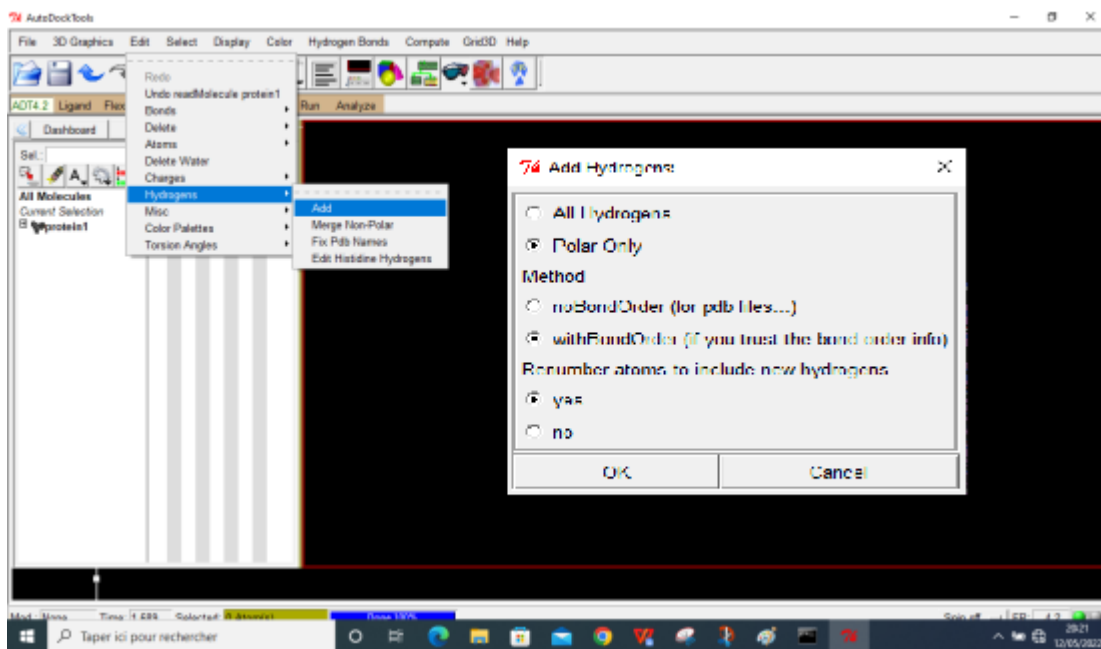


Figure 8 Préparation de la protéine (suite).

- Sauvegarder la protéine prête sous format « .pdbqt » dans le dossier du ligand précédemment créé.

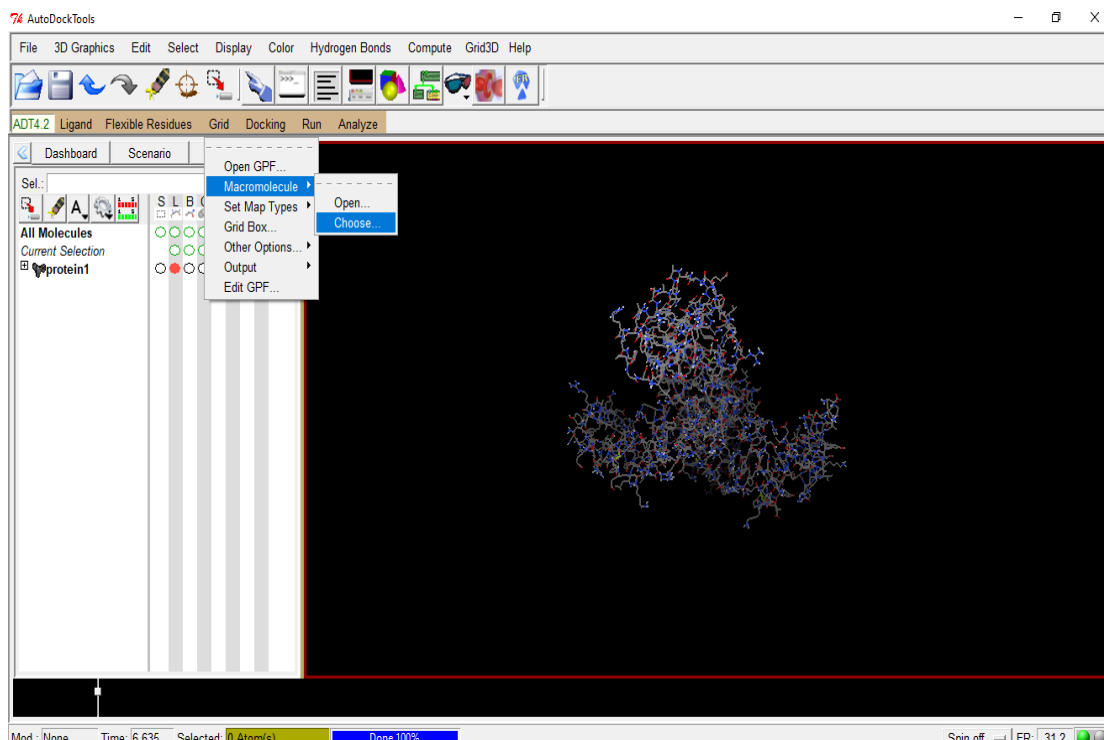


Figure 9 Enregistrement de la protéine préparé sous format pdb.

2.1.1.5 Préparation des ligands :

1. Ouvrir le fichier ligand (sous format « .sdf ») dans PyMol pour le convertir en format (.pdbqt) et sauvegarder dans le dossier crée.

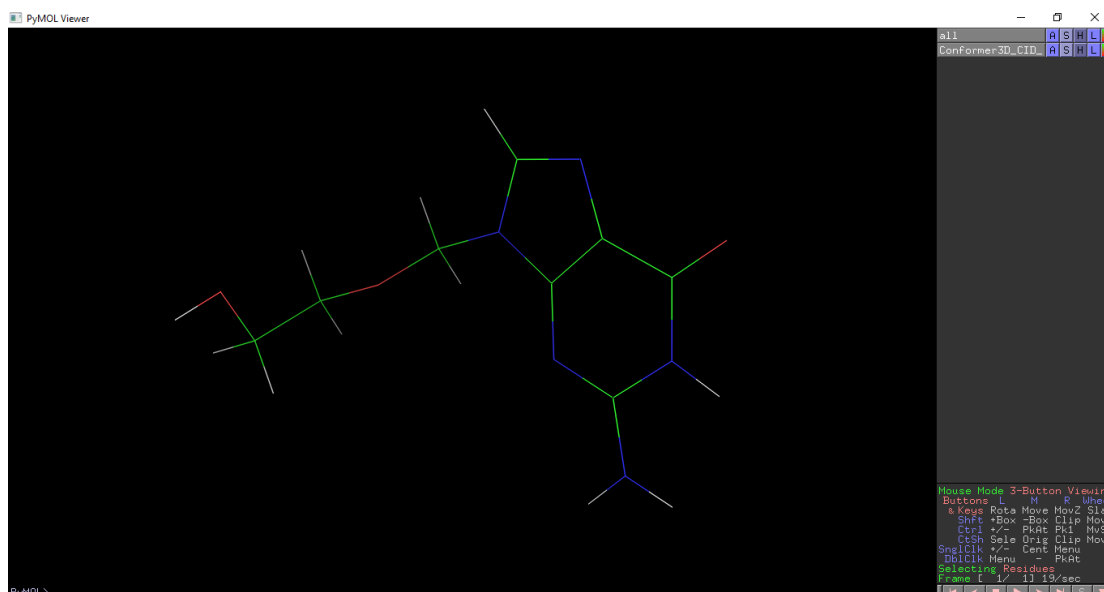


Figure 10 Conversion du format du ligand.

2. Ouvrir le fichier sauvegardé dans AUTODOCKSTOOLS. Puis, presser sur « Input » pour saisir le ligand. Ensuite, presser sur « output » pour avoir un ligand prêt sous format

« .pdbqt ».

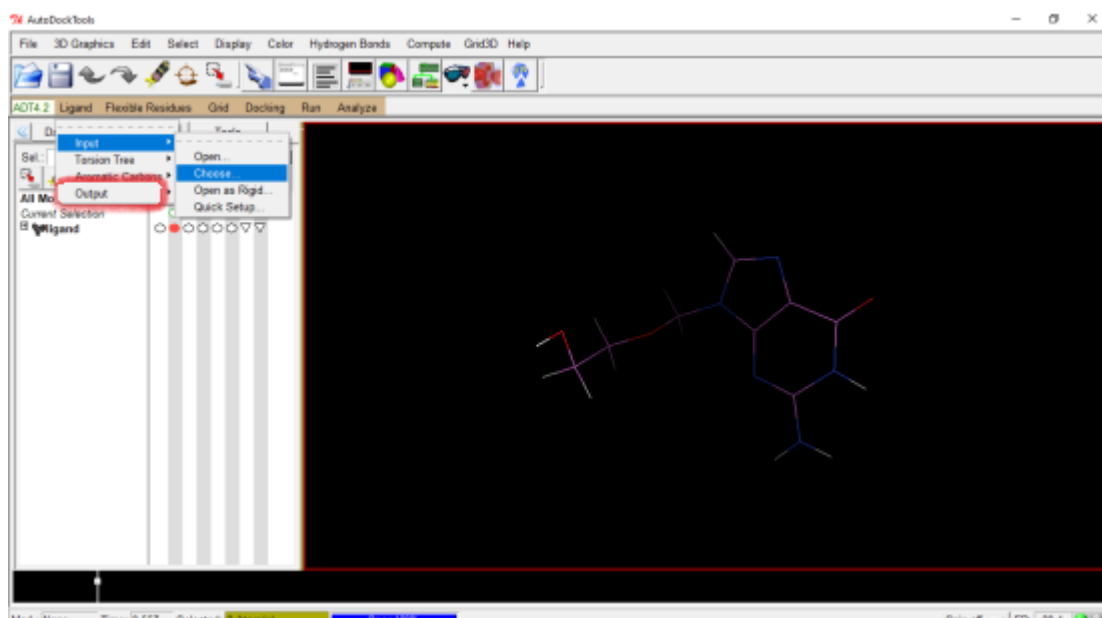


Figure 11 Enregistrement du ligand préparé.

3. Ouvrir le ligand et la protéine dans AUTODOCKSTOOLS en même temps :

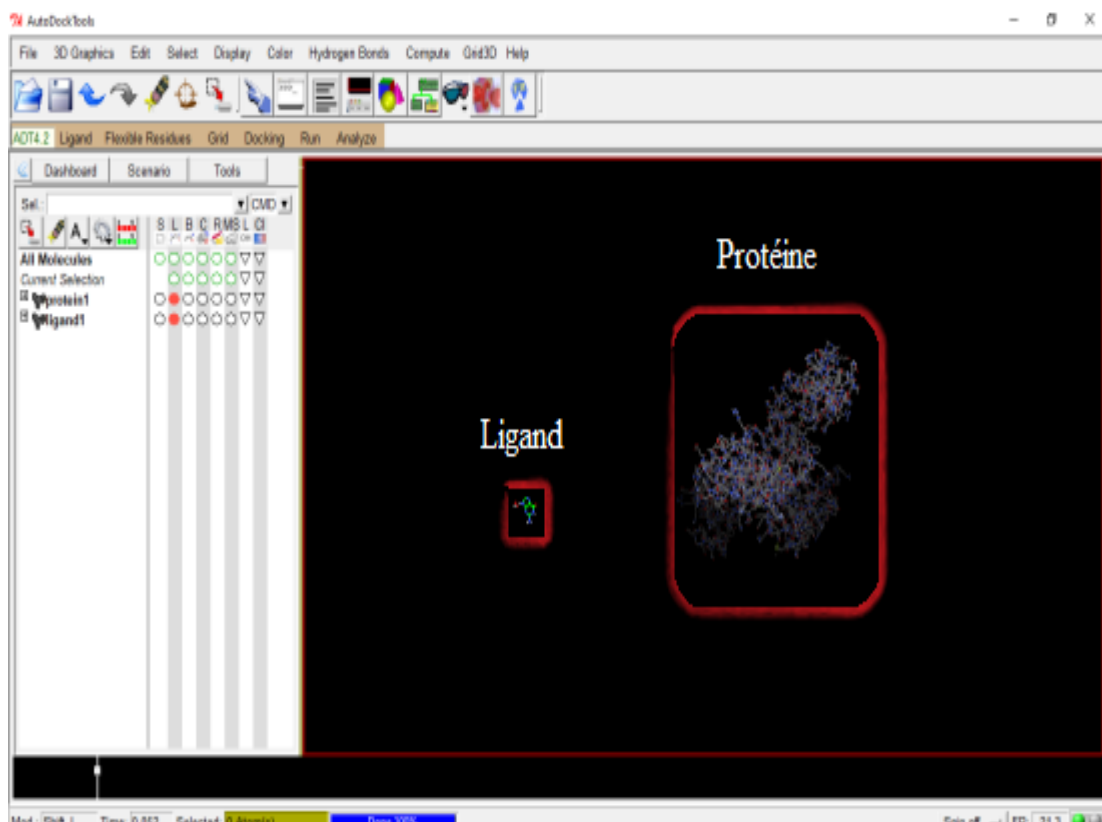


Figure 12 L'ouverture du ligand avec la protéine.

4. Appuie sur « Grid box » pour obtenir les dimensions du e principe actif et de la protéine. Puis, sauvegarder les dimensions sous format « (.txt) ».

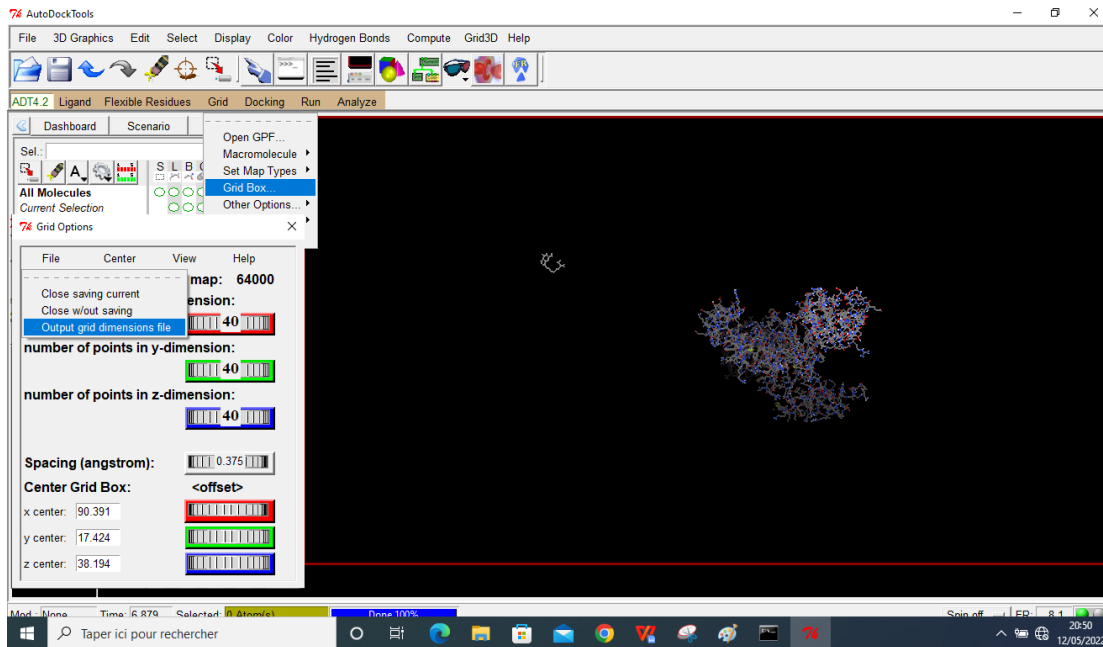


Figure 13 Obtention des données du site actif.

5. Copier les trois fichiers d'AUTODOCKSVINA télécharger précédemment et coller dans le dossier de ligand créé.

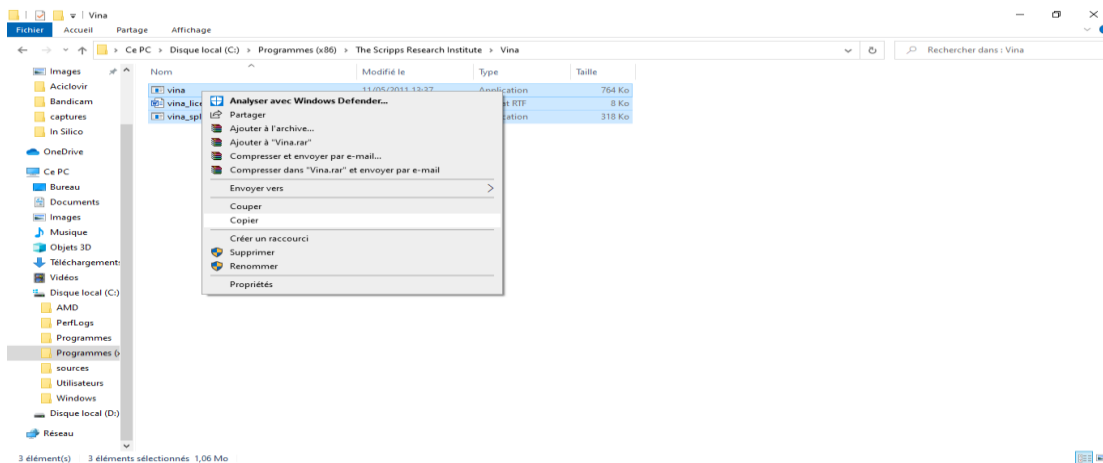


Figure 14 Déplacement de l'auto dock vina dans le dossier du ligand.

2.1.1.6 Préparation d'une commande spécifique comportant les informations de grid et le nom du fichier de la protéine et du ligand et deux autres fichiers pour calculer les affinités.

"C:\Program Files (x86) \The Scripps Research Institute\Vina**vina.exe**" --receptor **protein.PDBQT** --ligand **ligand.PDBQT**--center_x -16.847 --center_y -3.502 --center_z -14.789 --size_x 40 --size_y 40 --size_z 40 --energy_range 4 --exhaustiveness 8 --log log.txt --out **output.pdbqt**.

- Copier l'URL du dossier créé et la commande dans l'invite commande.

```

Microsoft Windows [version 10.0.18363.752]
(c) 2019 Microsoft Corporation. Tous droits réservés.

C:\Users\pc>cd C:\Users\pc\Desktop\proteine\Aciclovir
C:\Users\pc\Desktop\proteine\Aciclovir>C:\Program Files (x86)\The Scripps Research Institute\Vina\vina.exe --receptor protein.PDBQT --ligand ligand.PDBQT --center_x -16.847 --center_y -3.502 --center_z -14.789 --size_x 40 --size_y 40 --size_z 40 --energy_range 4 --exhaustiveness 8 --log log.txt --out output.pdbqt.
  
```

Figure 15 Définition de l'emplacement du dossier sur la commande.

2.1.1.7 Déduire l'affinité du ligand à l'égard de la protéine dans un nouveau fichier log.txt.

```

# with a new scoring function, efficient optimization and #
# multithreading, Journal of Computational Chemistry 31 (2010) #
# 455-461 #
# DOI 10.1002/jcc.21334 #
# Please see http://vina.scripps.edu for more information. #
#####
WARNING: The search space volume > 27000 Angstrom^3 (See FAQ)
Detected 4 CPUs
Reading input ...

Error: could not open "protein.PDBQT" for reading.

C:\Users\pc\Desktop\proteine\Aciclovir>C:\Program Files (x86)\The Scripps Research Institute\Vina\vina.exe --receptor protein.PDBQT --ligand ligand.PDBQT --center_x -16.847 --center_y -3.502 --center_z -14.789 --size_x 40 --size_y 40 --size_z 40 --energy_range 4 --exhaustiveness 8 --log log.txt --out output.pdbqt.
#####
# If you used AutoDock Vina in your work, please cite: #
# #
# O. Trott, A. J. Olson, #
# AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking #
# with a new scoring function, efficient optimization and #
# multithreading, Journal of Computational Chemistry 31 (2010) #
# 455-461 #
# DOI 10.1002/jcc.21334 #
# Please see http://vina.scripps.edu for more information. #
#####
WARNING: The search space volume > 27000 Angstrom^3 (See FAQ)
Detected 4 CPUs
Reading input ... done.
Setting up the scoring function ... done.
Analyzing the binding site ... done.
Using random seed: -1834445312
Performing search ... done.
Refining results ... done.

mode | affinity | dist from best mode
| (kcal/mol) | rmsd l.b. | rmsd u.b.
-----|-----|-----|-----|-----|
1 | -4.7 | 0.000 | 0.000
2 | -4.3 | 19.000 | 20.157
3 | -4.2 | 14.707 | 15.971
4 | -4.1 | 25.056 | 25.914
5 | -3.6 | 19.655 | 21.000
6 | -3.5 | 24.970 | 26.306
7 | -3.2 | 13.238 | 15.268
8 | -3.2 | 14.859 | 16.621
9 | -2.9 | 9.138 | 11.161
  
```

Figure 16 Récupération des scores affinités.

- En fin, on prend les meilleures affinités obtenues.

2.2 Partie *in vitro* :

Cette partie est indépendante de la partie précédente « *in silico* », elle est menée de manière empirique. Les médicaments candidats testés dans cette partie figurent dans le tableau n°1.

2.2.1 Préparation des médicaments :

- Les médicaments sont soit en comprimé, soit en poudre. Ils sont par préalablement dissous dans l'eau distillée stérile.
- La concentration finale d'un médicament quel que soit ce dernier est toujours égale à **10 umol/l**.

Exemple de préparation d'un médicament :

Methylprednisolone:

$$m = 0.04 \text{ g} \qquad M = 374,5 \text{ g / mol} \qquad / v = 1 \text{ l}$$
$$n = 0.04 / 374.5 = \mathbf{1.06 * 10^{-4} \text{ mol}} \qquad C = n/v = 1.38 * 10^{-4} \text{ mol/l}$$

Pour préparer une solution de **1000 ml** et une concentration de **10umol/l** à partir de cette solution on cherche le volume à diluer :

$$C_1V_1 = C_2V_2 \quad \longrightarrow \quad V_1 = (C_2V_2) / C_1 = (10 \text{ umol} * 0.1) / 1.38 * 10^{-4} \text{ mol/l}$$

$$V_1 = 7.2 \text{ ml}$$

2.2.2 Vérification du profil de résistance des souches test :

Le test de vérification du profil de résistance a été fait par la technique de diffusion des disques sur milieux gélose (gélose Mueller Hinton) pour l'évaluation des points de rupture et catégoriser les phénotypes MDR de chaque souche (**PEYCLIT, 2020**).

- Des suspensions bactériennes d'*E. coli* et de *K. pneumoniae* ont été préparées.
- À l'aide d'un écouvillon, nous avons placé l'inoculum bactérien préparé sur de la gélose Mueller Hinton.
- La gélose imprégnée de disques antibiotiques a ensuite été incubée dans une étuve à 37°C pendant 24 heures.
- Le diamètre de l'inhibition présente autour du disque est mesuré.

2.2.3 Préparation des isolats et dilution des souches

- Inoculation des souches dans un milieu TSA à 37°C pendant 18-24h.
- Mise en suspension à 0.5 MacFarland dans NaCl 0.9% (10^8 C/ml) et dilution 100 fois (10^6 UFC/ml) dans un bouillon CAMHB. (PEYCLIT, 2020).

2.2.4 Criblage empirique des médicaments candidats :

- Préparation des tubes dans un portoir avec 80µl CAMHB, 10µl de médicaments à 10µmol/l et 10µl de chaque souche à 10^6 UFC/ml avec un contrôle négatif et un contrôle positif.
- Incubation à 37°C pendant 18-24h en mode statique.
- L'absorbance de la croissance bactérienne est lue à l'aide de spectrophotomètre à 505 nm
- Selon l'équation suivante on peut déduire le taux d'inhibition de la croissance bactérienne : (PEYCLIT, 2020).

L'inhibition de la croissance bactérienne (%)

$$= \left\{ 1 - \left(\frac{A \text{ échantillon} - A \text{ négative}}{A \text{ positive} - A \text{ négative}} \right) \right\} \times 100$$

Absorbance échantillon : Absorbance (bactérie + médicament + CAMHB).

Absorbance négative contrôle : Absorbance (CAMHB).

Absorbance positive contrôle : Absorbance (bactérie + CAMHB).

- ✓ Les candidats peuvent être sélectionnés lorsque le taux d'inhibition de la croissance est supérieur à 90%.

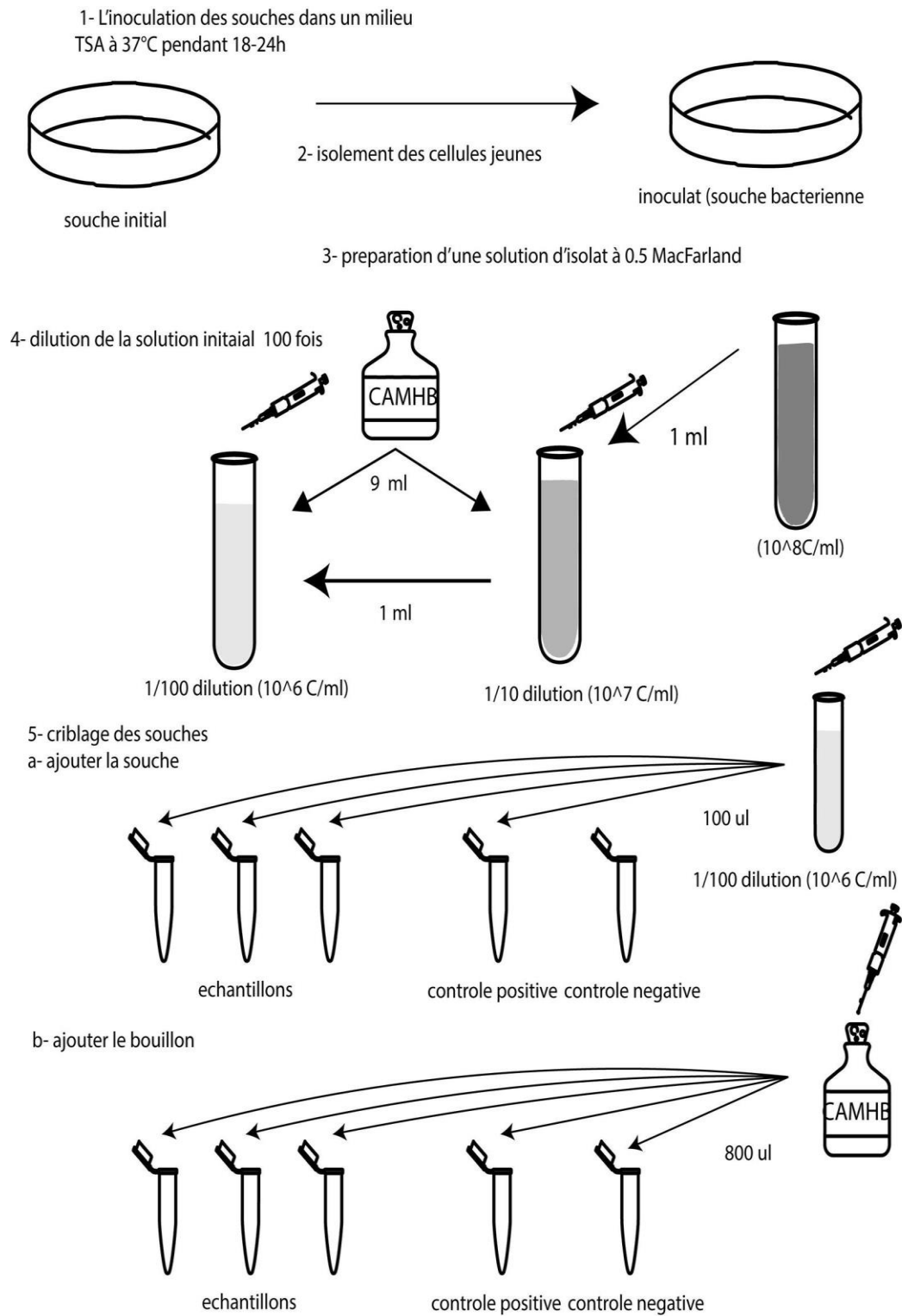


Figure 17 : Protocole du criblage des molécules médicamenteuses.

c- ajouter le medicament

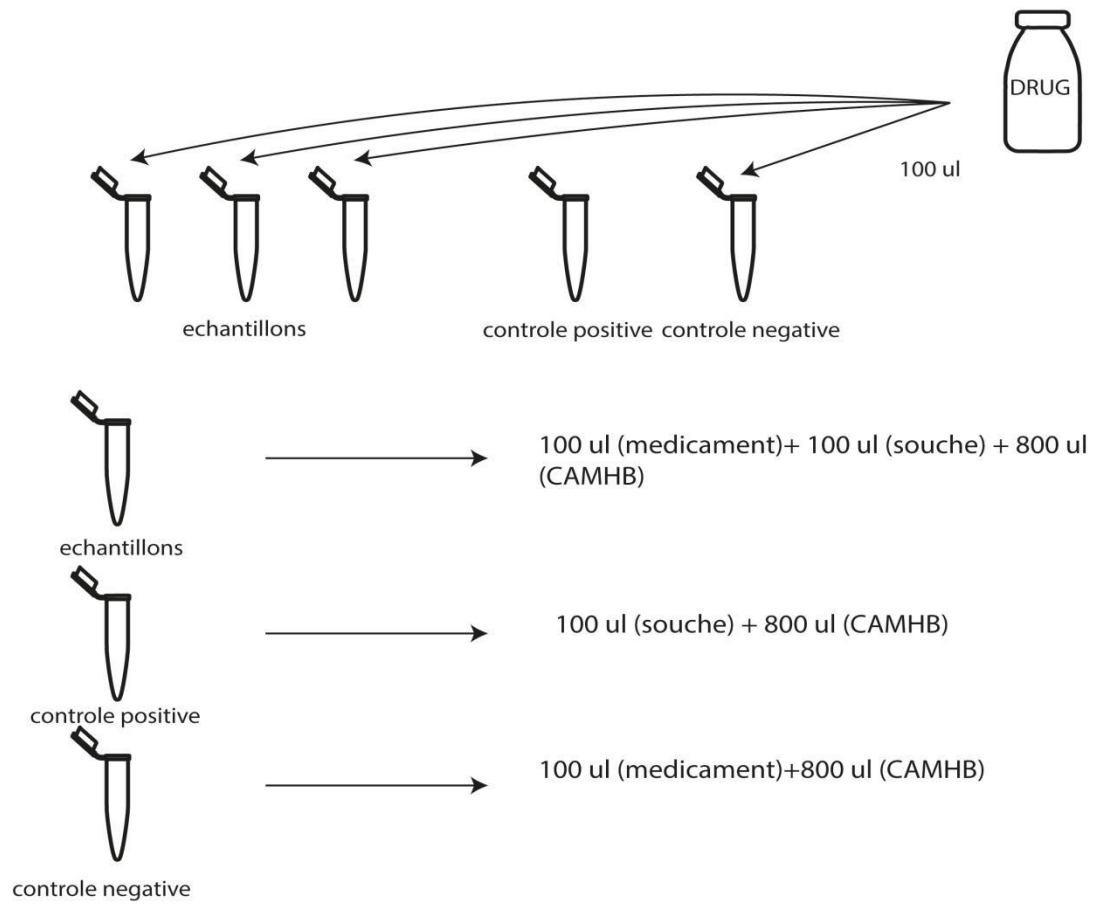


Figure 17: protocole du criblage des molécules (suite).

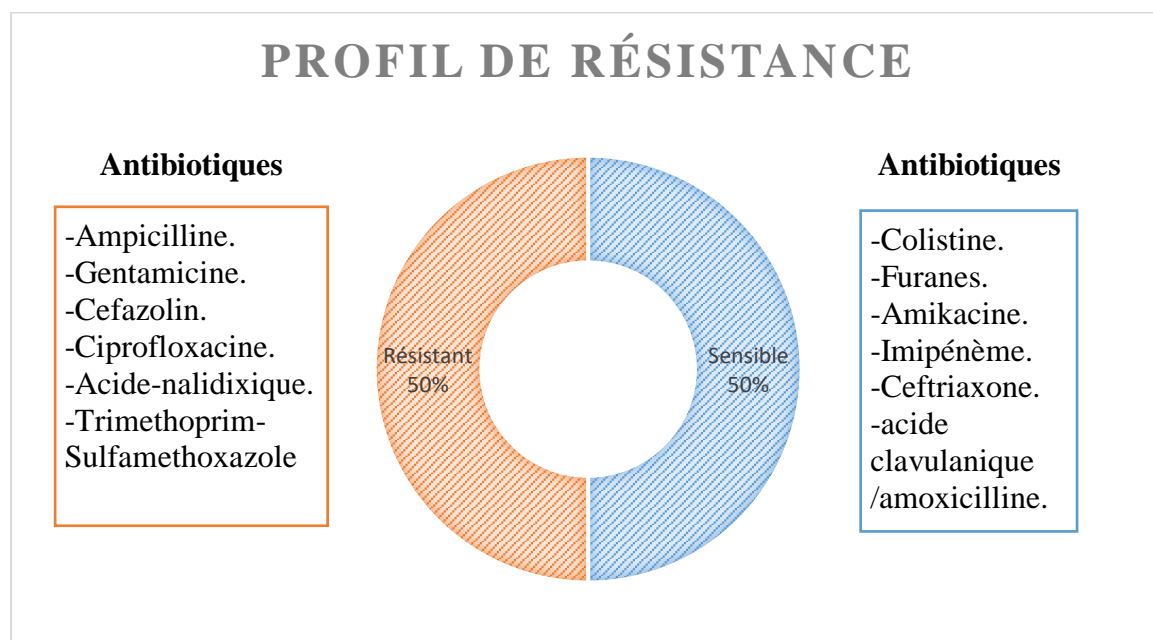


Partie 3 :
Résultats et discussions

1 Confirmation des profils de résistance des souches tests :

Profil de résistance d'*E. coli* :

Les résultats de l'antibiogramme représentés dans la figure n°19 montrent que la souche test *E. coli* est multirésistante car elle répond à la définition standardisée des BMR. Elle est effectivement résistante à au moins trois antibiotiques appartenant à au moins trois classes d'antibiotiques (Magiorakos et al., 2012)

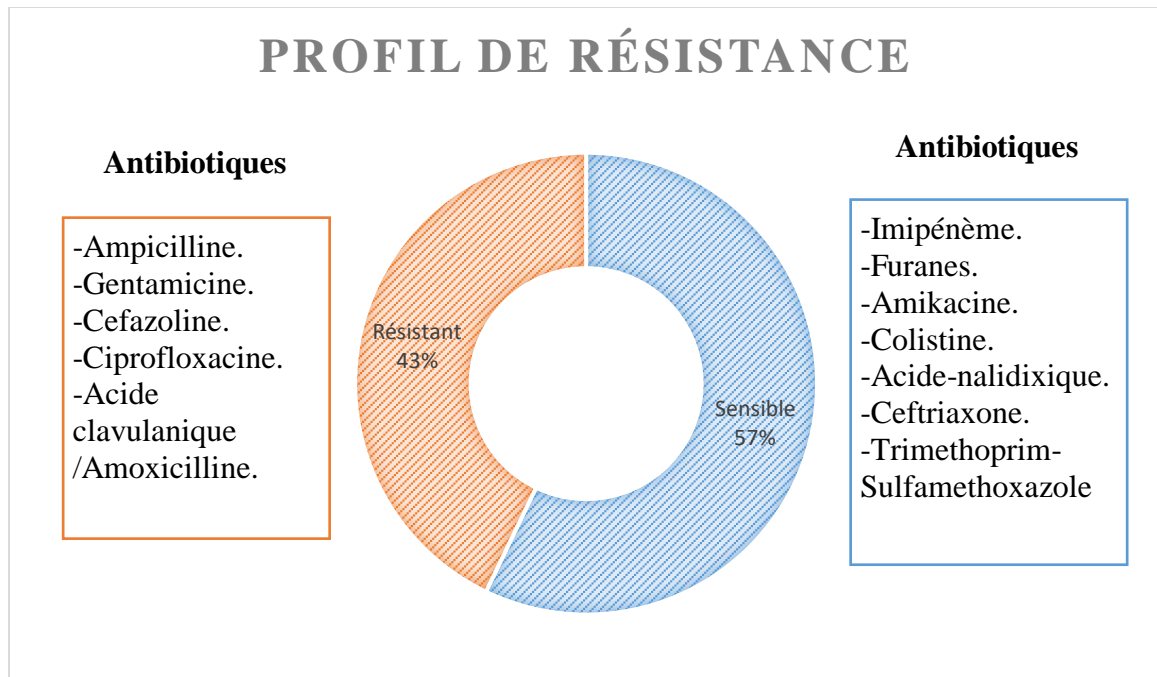


Profil de résistance d'*Escherichia coli*.

Profil de résistance de *Klebsiella pneumoniae* :

Les résultats d'antibiogramme sont représentés dans la figure n°20, La souche a présenté une résistance contre Ampicilline, Gentamicine, Céfazoline, Ceftriaxone et l'association Acide Clavulanique/ Amoxicilline

PROFIL DE RÉSISTANCE



2 Mécanisme de résistance des deux souches :

Cette résistance est causée par deux mécanismes, l'un face à la beta lactamines et l'autre face à la quinolone.

La résistance aux bêta lactamines est due à deux mécanismes, l'une est assurée par le retrocontrôle des porines qui assure une réduction de la perméabilité des antibiotiques au niveau de membrane externe. L'autre est faite par l'enzyme bêta lactamase qui clive les bêta lactamines qui passent par la membrane externe au niveau d'acide aminée LEU82 des bêta lactamines chez l'*E.coli*.

La résistance aux fluoroquinolones est due à des mutations ponctuelles dans des zones spécifiques de l'ADN gyrase (gènes *gyrA* et *gyrB*) et de la topo isomérase IV (gènes *parC* et *parE*), appelée région déterminante de la résistance aux quinolones. La première cible de la résistance aux quinolones chez les micro-organismes à Gram négatif est *gyrA* puis *parC*. Plusieurs mutations simultanées de ces gènes augmentent la résistance de haut niveau. De plus, des mécanismes de résistance acquis par des éléments génétiques mobiles, comme l'acquisition de protéines « Qnr » (résistance aux quinolones) qui protègent l'ADN gyrase et le topo isomérase IV. L'altération de la perméabilité et la présence de pompes à efflux (pompe RND) sont également des mécanismes impliqués dans la résistance aux quinolones. (Moya &Maicas, 2020).

3 Résultats de La prédiction *in silico* (amarragemoléculaire) :

Nous avons sélectionné cent neuf molécules non antibiotiques appartenant à différentes classes médicamenteuses ; antiviraux ; antiparasitaires ; antimycosiques ; antifongiques ; antihistaminiques, antihypertenseurs, antidépresseurs et anti-inflammatoires. Le principe de la prédiction repose sur le score d'affinité protéine-ligand, plus ce score d'affinité est bas la probabilité d'établir une liaison augmente (Seeliger & de Groot, 2010).

Les diagrammes ci-dessous représentent les scores d'affinités pour les différentes protéines cibles.

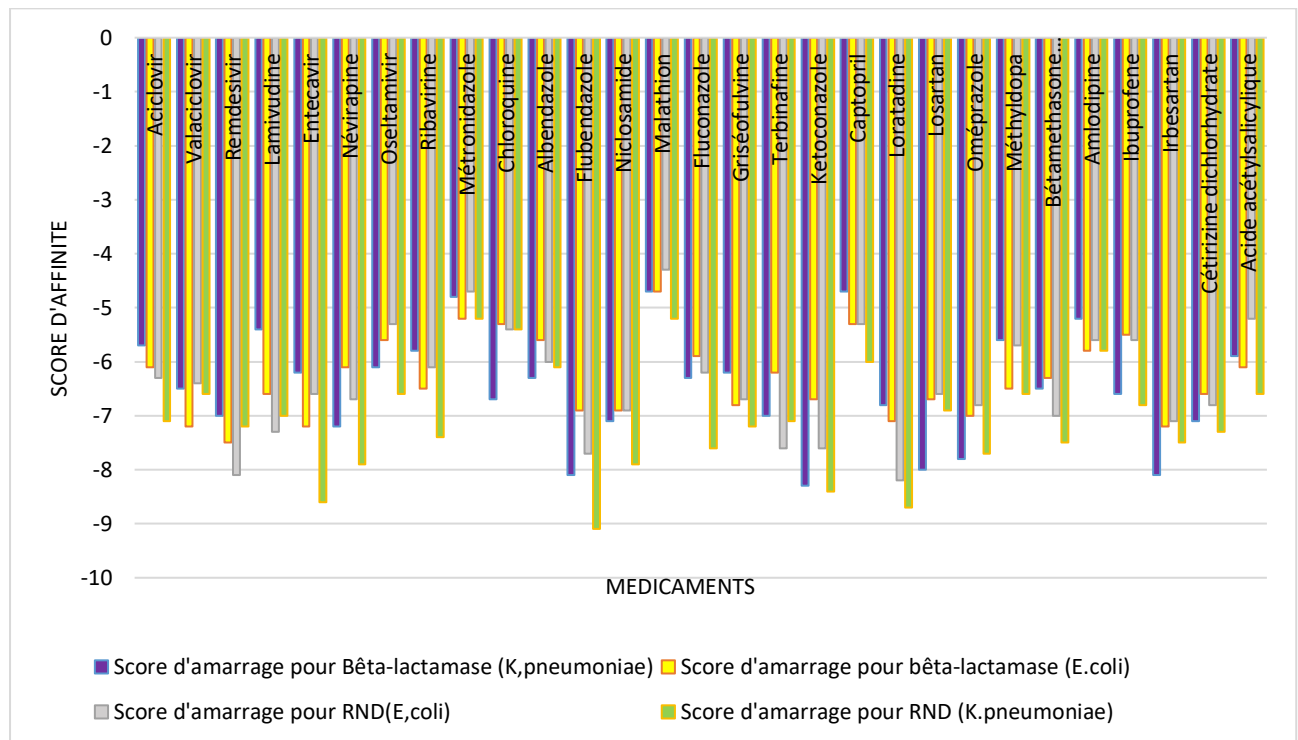


Figure 18 : score d'affinité pour les protéines cibles.

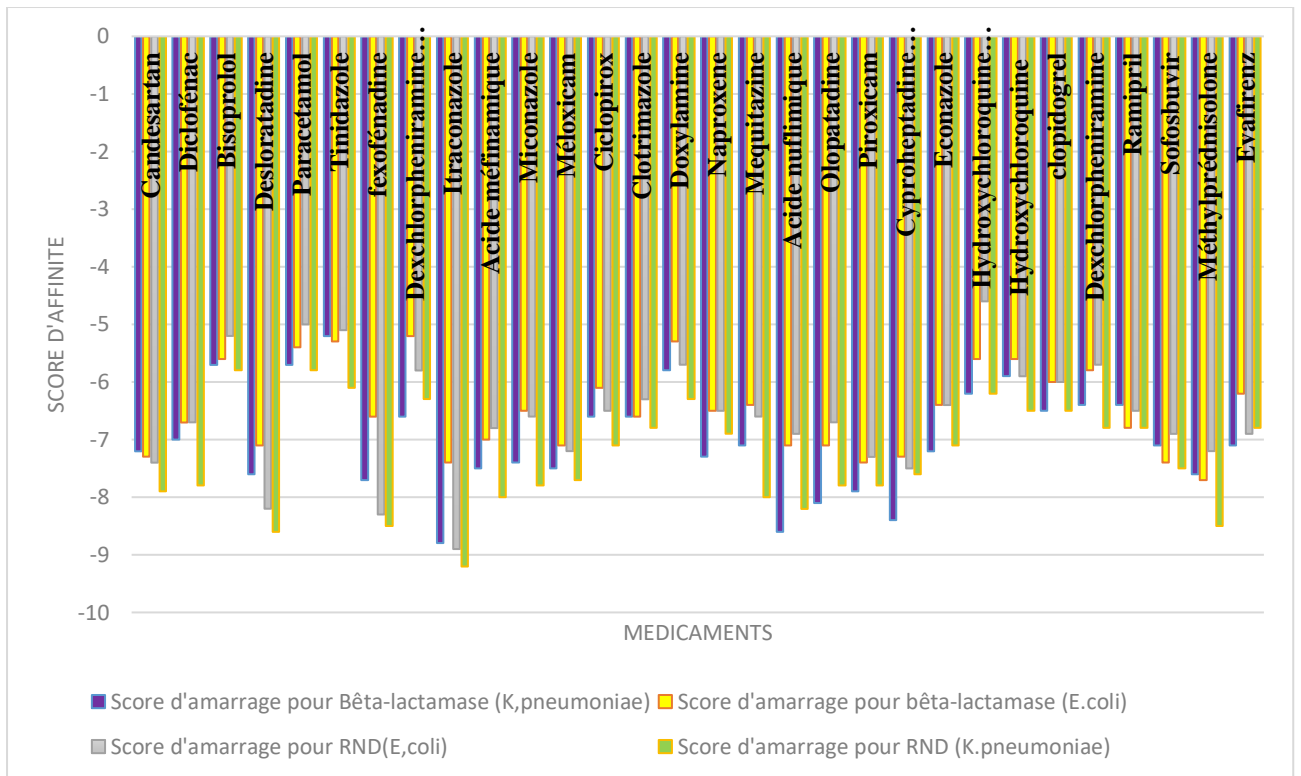


Figure 19 : Score d'affinité pour les protéines cibles (suite).

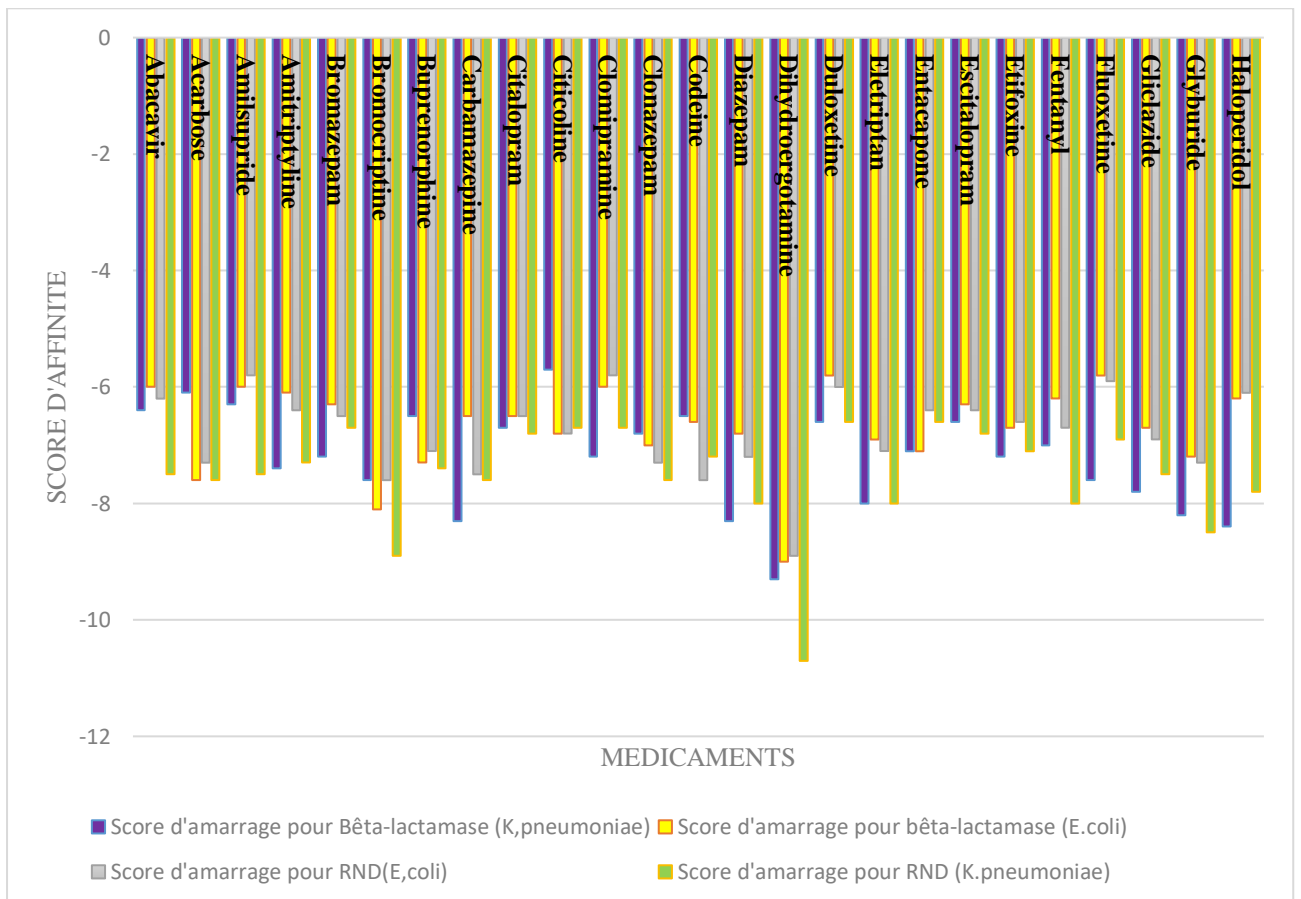


Figure 20:score d'affinité pour les protéines cibles (suite).

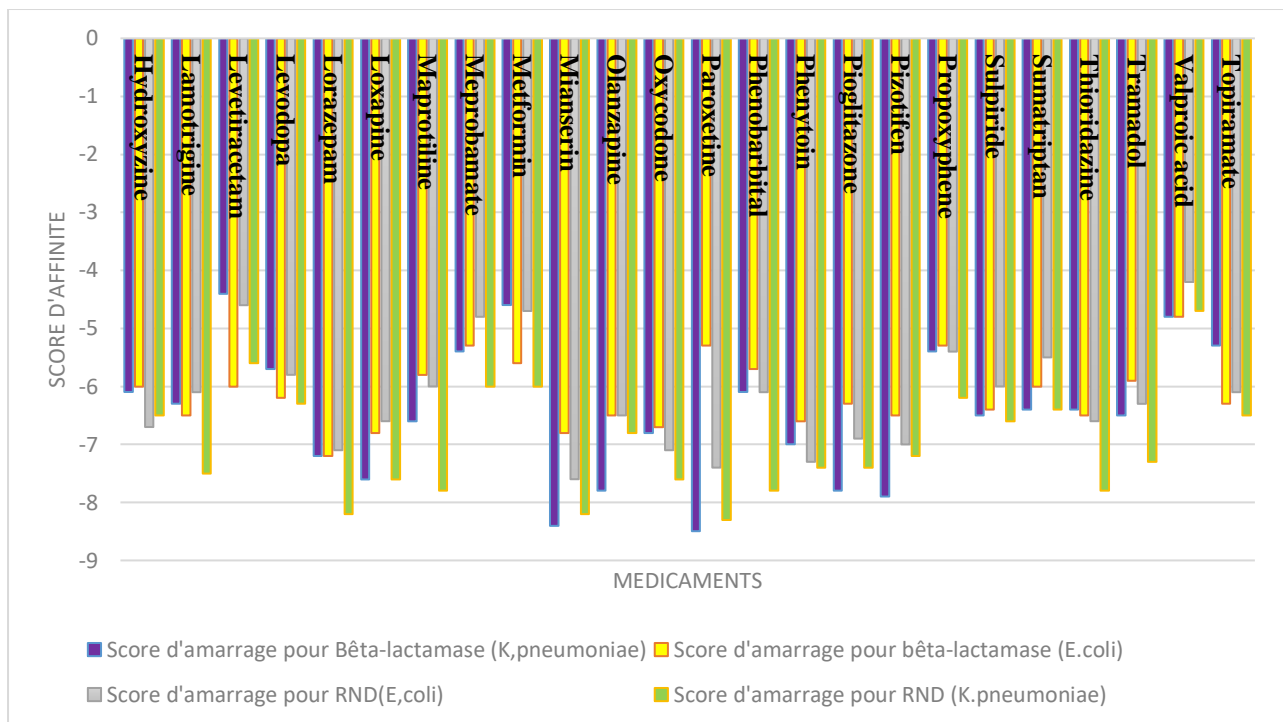


Figure 21 : Score d'affinité pour les protéines cibles (suite).

3.1 Beta lactamase :

Dans ce travail, nous avons évalué les caractéristiques structurales des β -lactamases qui peuvent être liées à leur fonction et à leur sensibilité à des inhibiteurs candidats, l'amarrage moléculaire par l'autodockvina a donné des résultats satisfaisants puisque les molécules présentaient des affinités très élevés.

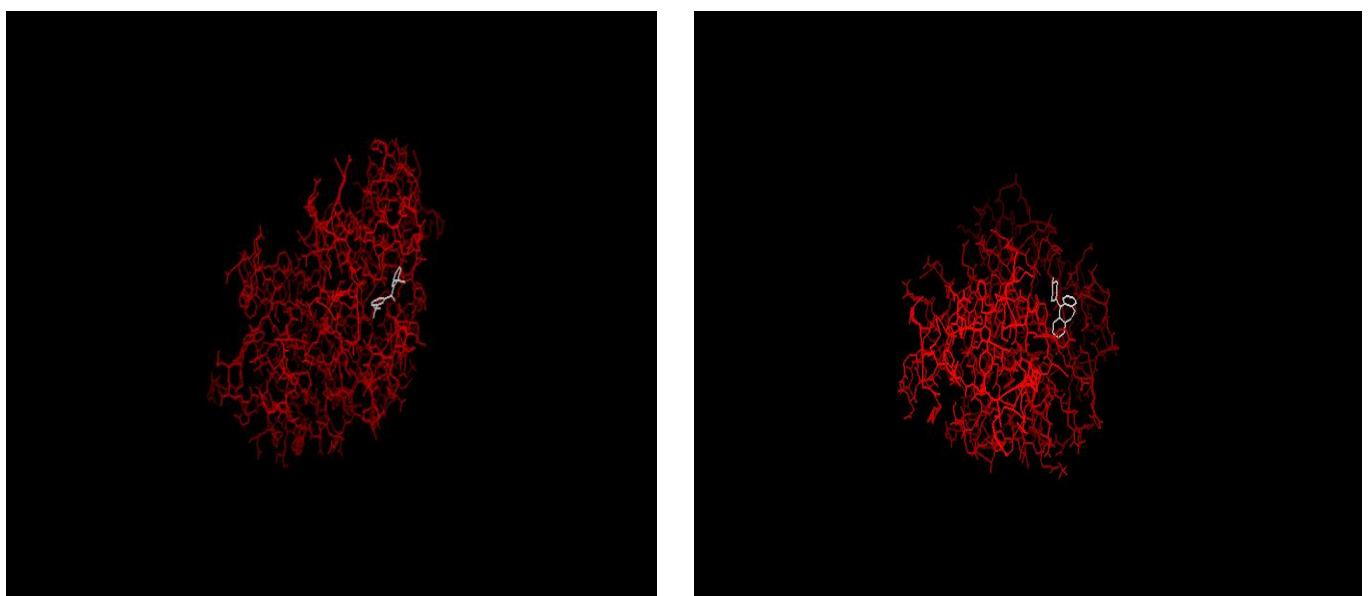
- **Quatorze molécules** présentent un score d'affinité moins de **-8 kcal/mol** pour la bêta-lactamase 6NFD du *Klebsiella pneumoniae*. Les meilleurs scores sont présentés par :
 - Le dihydroergotamine (antimigraineux) ; avec un score d'affinité de **-9.3kcal/mol**.
 - L'itraconazole (anti parasitaire) ; avec un score d'affinité de **-8.8kcal/mol**.
 - L'acide nuflimique (anti inflammatoire) ; avec un score d'affinité de **-8.6kcal/mol**.
 - Le paroxetine (antidépresseur) ; avec un score d'affinité de **-8.5kcal/mol**.
 - Le cyproheptadine (antihistaminique), l'halopéridol et le miaserin (antidépresseurs) ; avec un score d'affinité de **-8.4kcal/mol**.
 - Le carbamazépine (anti épilepsie), le ketoconazole (antifongique), le diazepam (anxiolytique) ont un score d'affinité de **-8.3kcal/mol**.
 - Le glyburide (utiliser dans le traitement du diabète type 2) ; avec un score d'affinité de **-8.2kcal/mol**.

- L'olopatadine (antihistaminique), le Flubendazole (anti helminthe), l'irbesartan (un antihypertenseur) ; avec un score d'affinité de **-8.1kcal/mol**.

Les affinités élevées présentées par ces médicaments laissent supposer qu'ils auront probablement le pouvoir d'inhiber la bêta-lactamase par le blocage de son site actif. Aussi ils peuvent faire une inhibition compétitive avec le médicament donc une diminution de la résistance.

L'association de l'un de ces inhibiteurs candidats avec un antibiotique appartenant aux bêta-lactamines pourrait probablement surmonter le problème de la résistance chez la bactérie *klebsiellapneumoniae*.

- Les scores d'affinité de -8 à 0 reflètent une basse affinité à l'égard de la protéine.
- Les scores d'affinités entre $-8 > \text{score} < -\infty$ reflètent une affinité élevée vis-à-vis de la



protéine.

Figure 22 : L'amarrage moléculaire d'acide niflumique et cyproheptadine la beta lactamase de *K.pneumooniae*.



Acide niflumique



Cyproheptadine

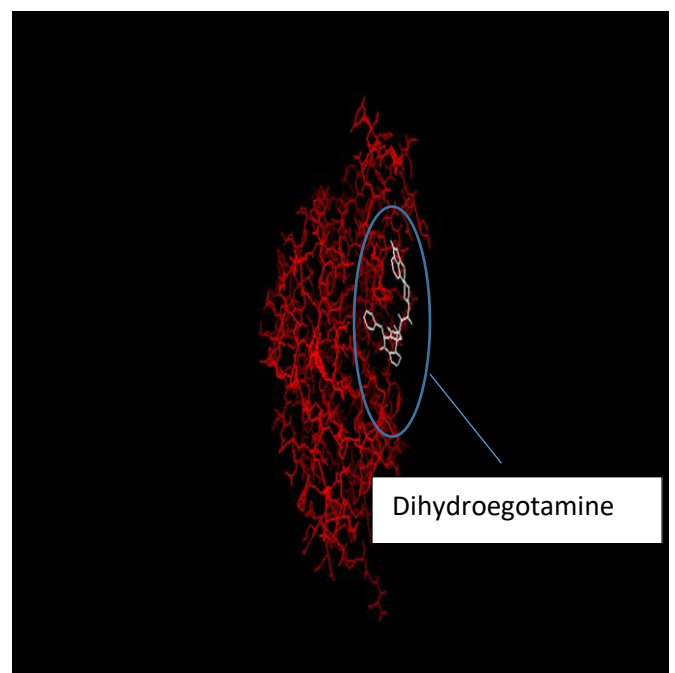
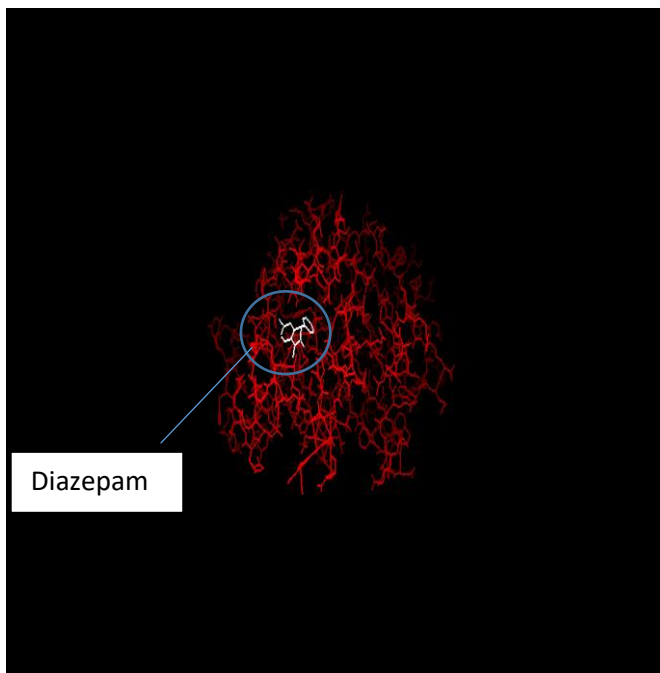


Figure 23 : L'amarrage moléculaire de diazepam et dihydroergotamine et la béta lactamase *k.pneumoniae*.

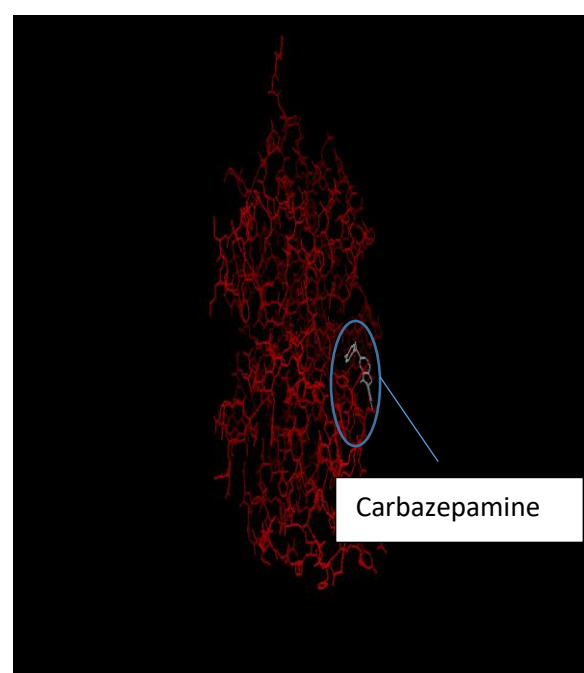
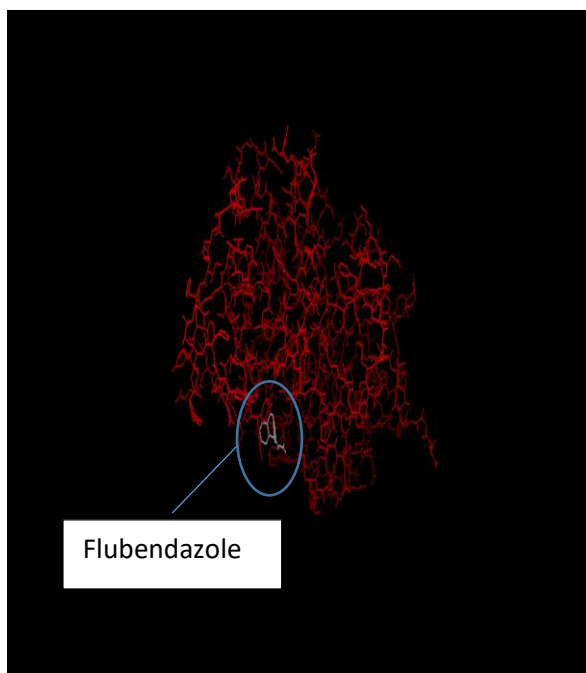


Figure 24 : L'amarrage moléculaire de la flubendazole et carbazepamine et la protéine beta lactamine de *K.pneumoniae*.

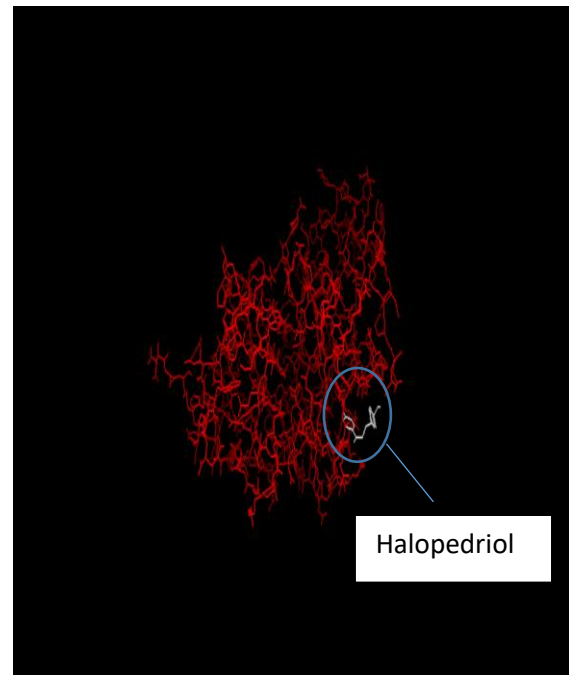
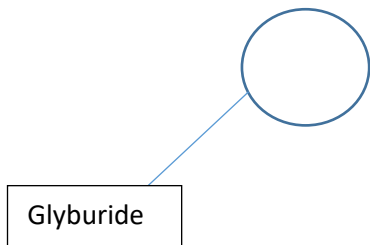
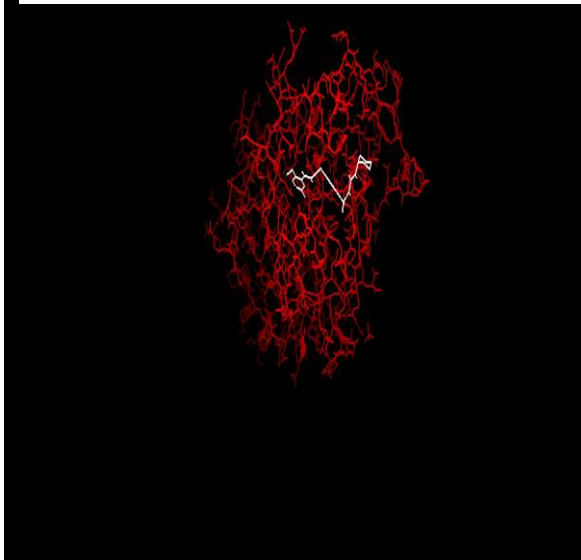


Figure 25 : L'amarrage moléculaire de la glyburide et la halopedriol avec la beta lactamase de *k.pneumoniae*.



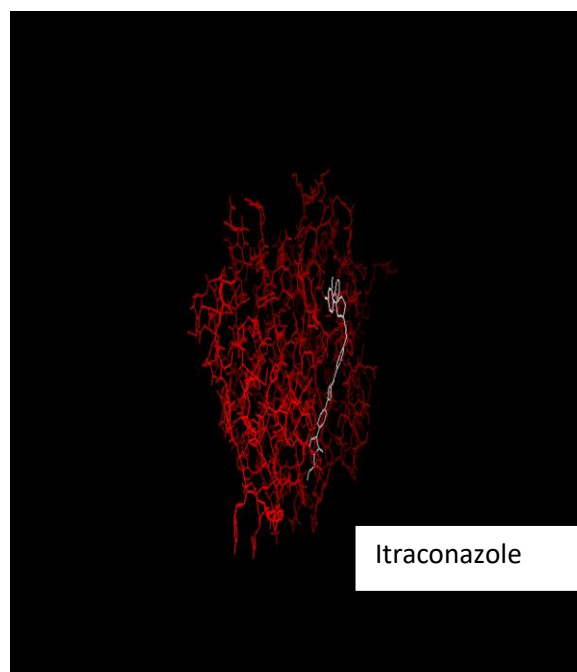
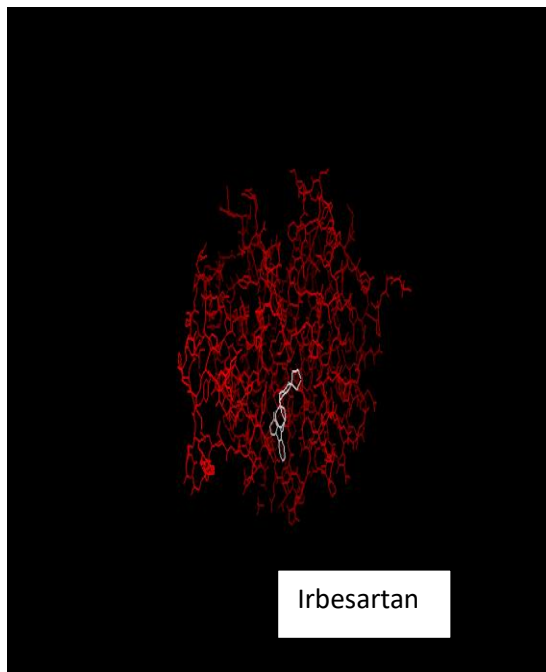


Figure 26 : L'amarrage moléculaire de l'irbesartan et l'itraconazole avec la beta lactamase de *K.pneumoniae*.

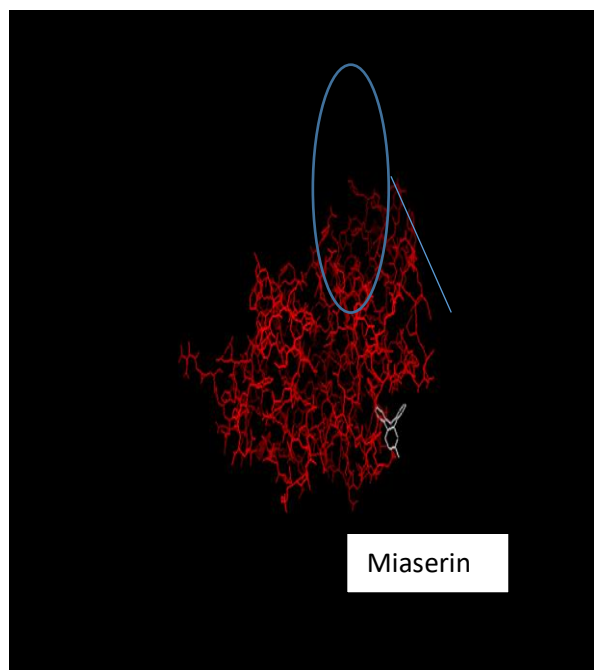
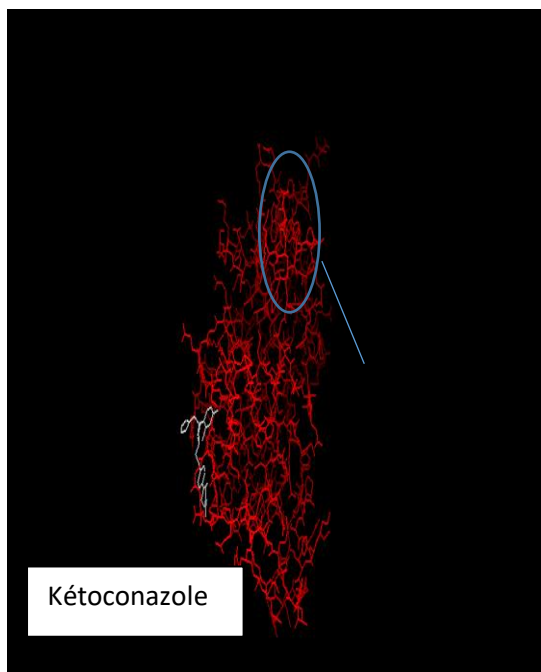


Figure 27 : L'amarrage moléculaire de la kétoconazole et la miaserin avec la beta lactamase de *k.pneumoniae*.



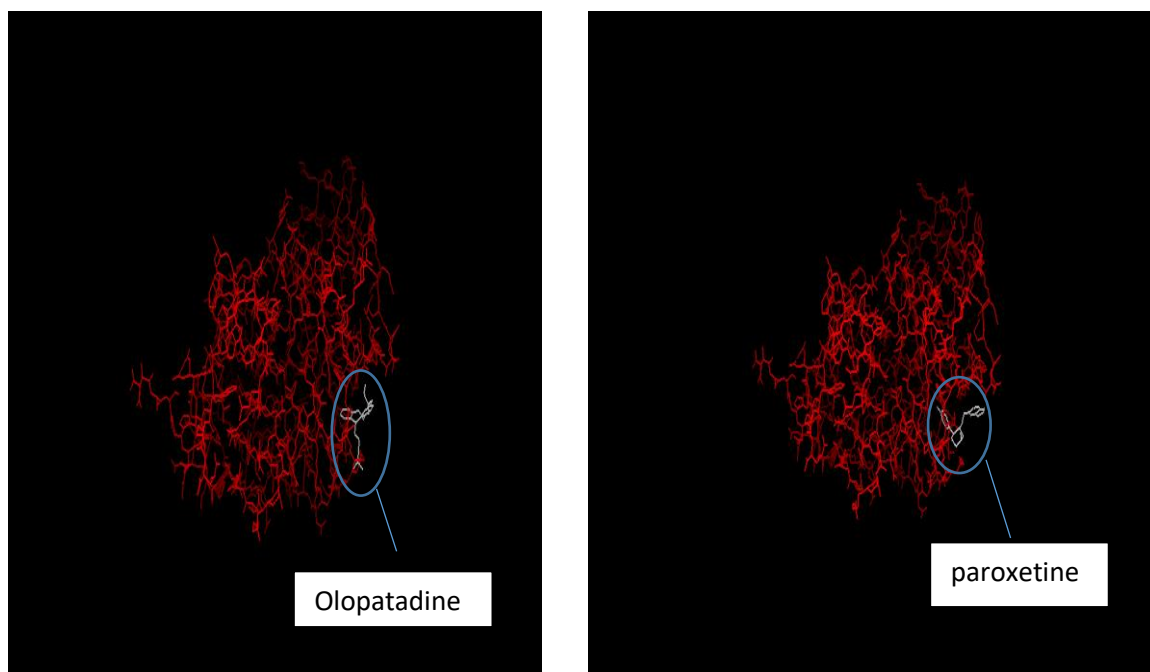


Figure 28 : L'amarrage moléculaire de l'olopatadine et la paroxetin avec la beta lactamase de *K.pneumoniae*.

Les scores d'affinité enregistrés pour les médicaments candidats ayant présenté une affinité vis-à-vis de la bêta-lactamase « 5kmu » d'*E.coli*. À savoir : Le dihydroergotamine avec un score d'affinité **-9.1 kcal/mol** et la bromocriptine (un inhibiteur de prolactine) avec un score d'affinité de **-8.1kcal/mol**.

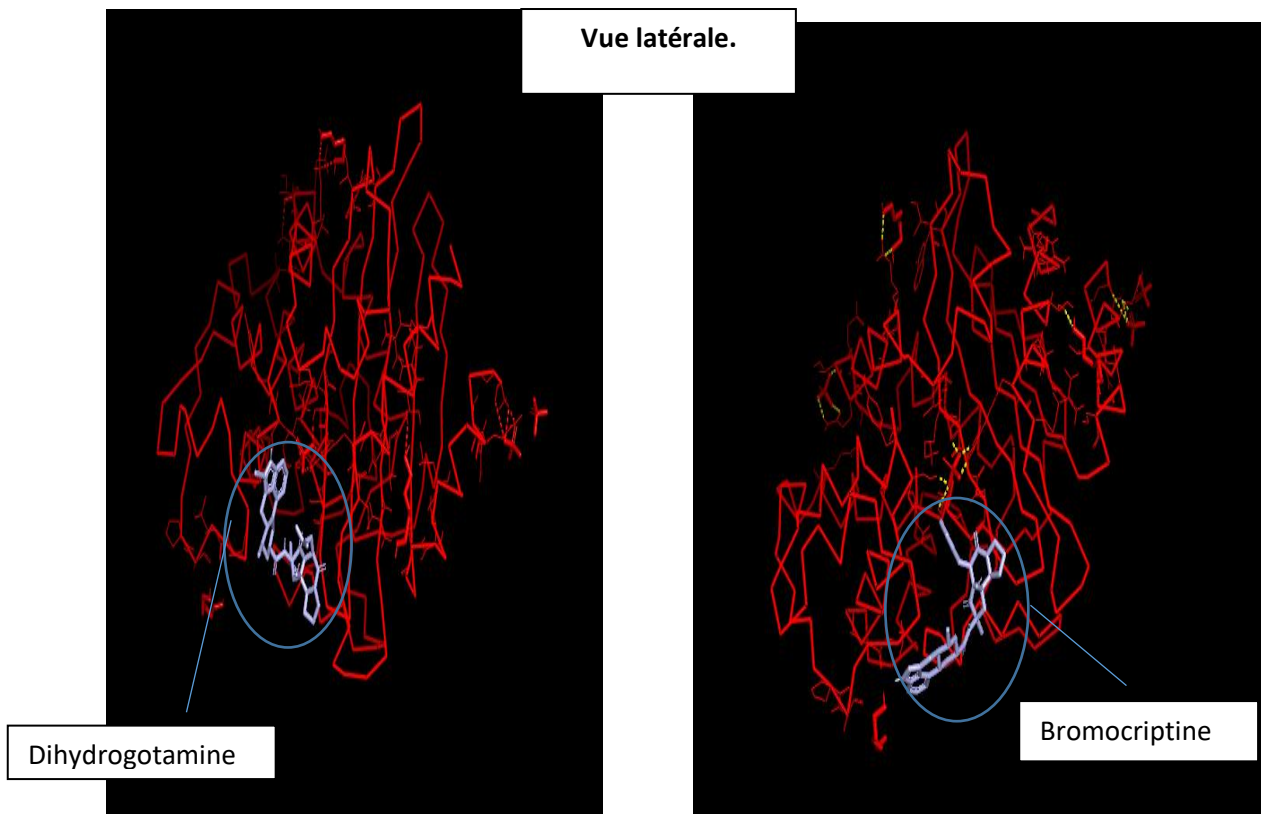


Figure 29 : L'amarrage moléculaire de la dihydroergotamine et bromocriptine avec la beta lactamase d'*E.coli*.

La figure 31 représente l'interaction entre les médicaments candidats qu'ont le plus haut score d'affinité avec la bêta-lactamase d'*E.coli* « 5kmu » au niveau de site actif.

3.2 Les pompes d'efflux RND :

L'amarrage moléculaire (l'étude *in silico* de l'interaction entre AcrB et les médicaments candidats) en ciblant une petite étendue du résidu appelée boucle de porte / commutateur qui sépare les poches de liaison au substrat proximale et distale qui caractérise ces transporteurs membranaires a révélé **que cinq molécules** présentent un score d'affinité moins de -8 ; comme pour les autres protéines (les bêta-lactamases) :

- Le Dihydroergotamine (anti migraineux) ; et l'itraconazole (antiparasitaire) ont un score identique **de 8.9kcal/mol.**
- Le fexofenadine (anti histaminique) avec un score d'affinité **-8.3kcal/mol**
- Le Desloratadine et loradatadine (anti histaminiques) ont un score d'affinité de **-8.2 kcal/mol.**

Le score d'affinité élevé et l'observation de la liaison médicaments-4zit par PYMOL suggère la capacité de ces médicaments à bloquer l'expulsion des antibiotiques à travers ces transporteurs membranaires.

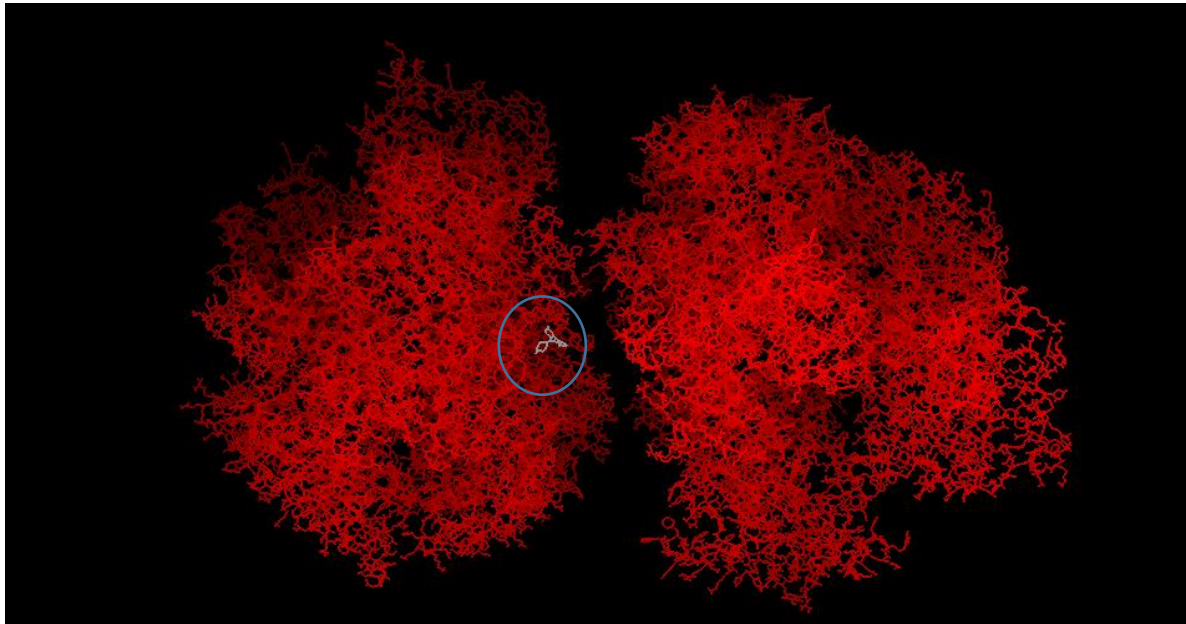


Figure 32 :L'amarrage moléculaire de la desloratadine avec la RND de l'*E.coli*.

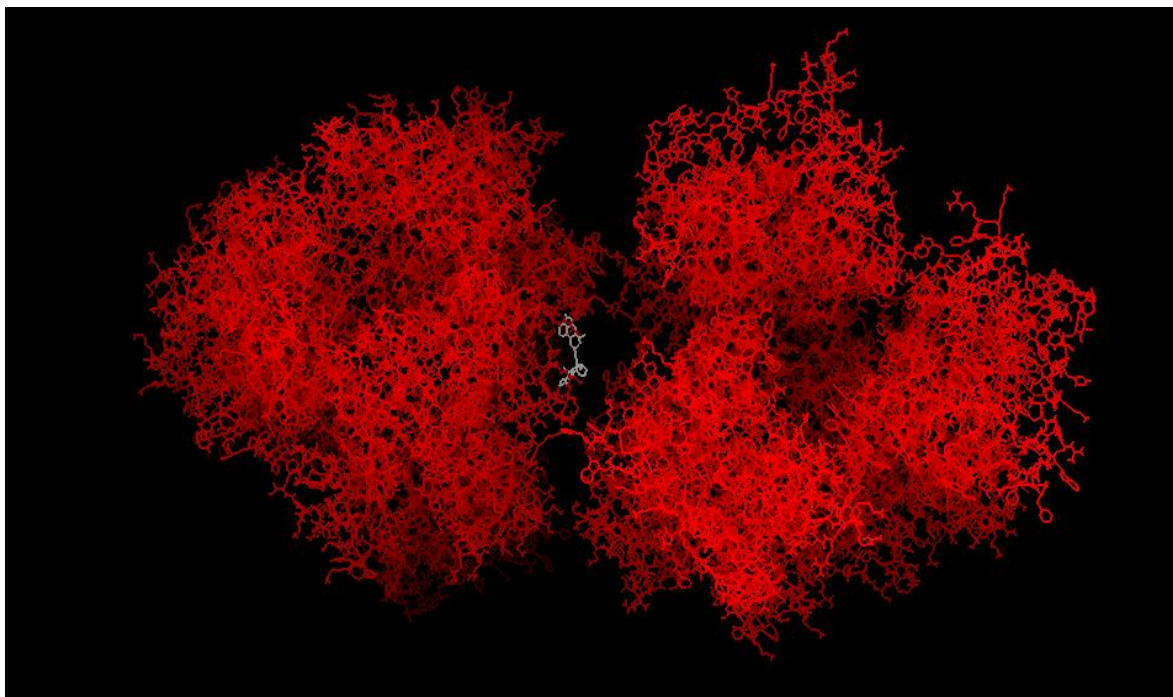


Figure 33 :L'amarrage moléculaire de le dihydroergotamine avec la RND de l'*E.coli*.

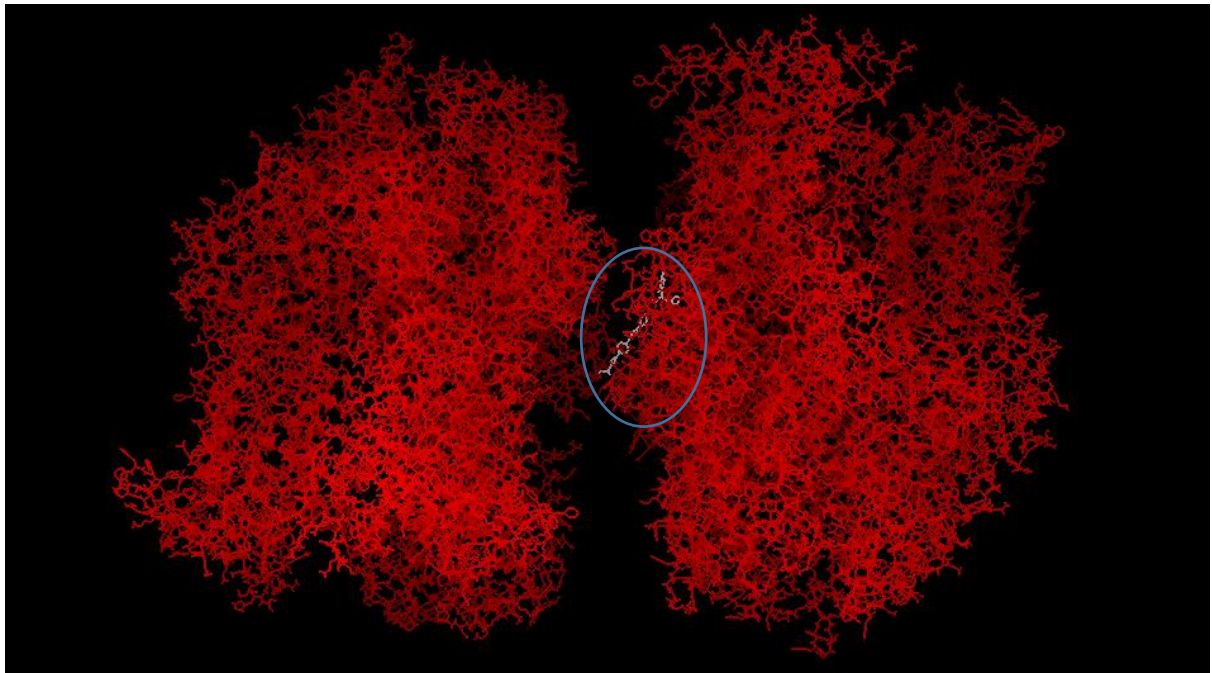


Figure 30 : L'amarrage moléculaire de l'itraconazole avec la RND d'*E.coli*

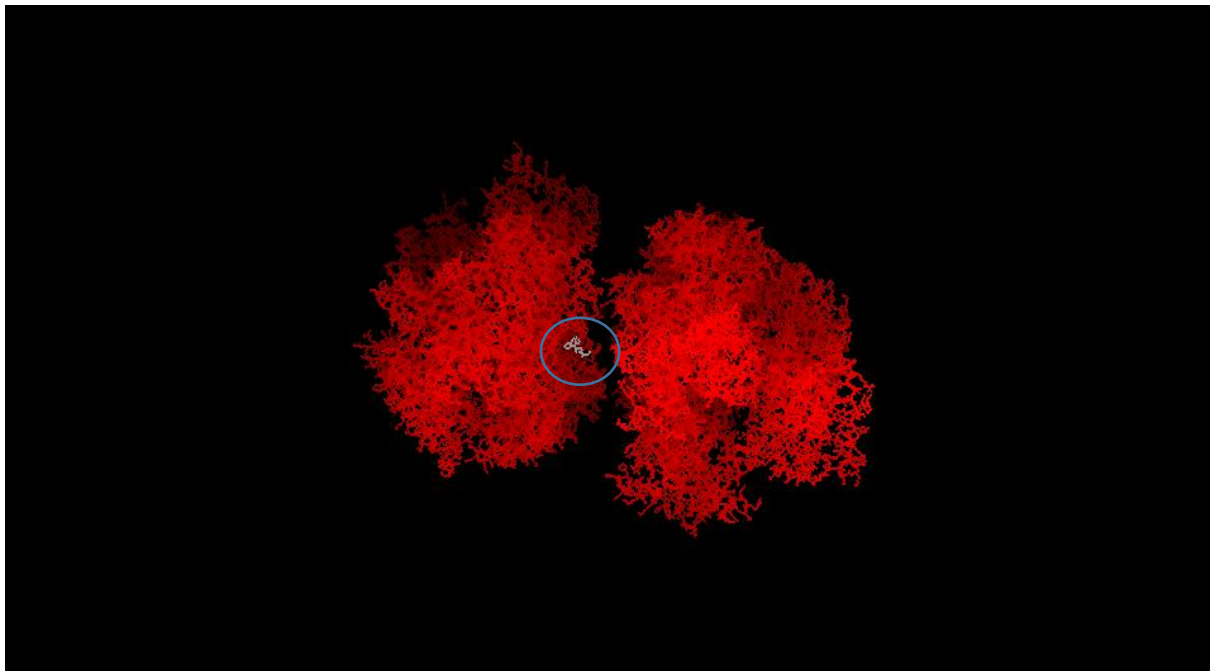


Figure 31 : L'amarrage moléculaire de la loratadine avec la RND d'*E.coli*.

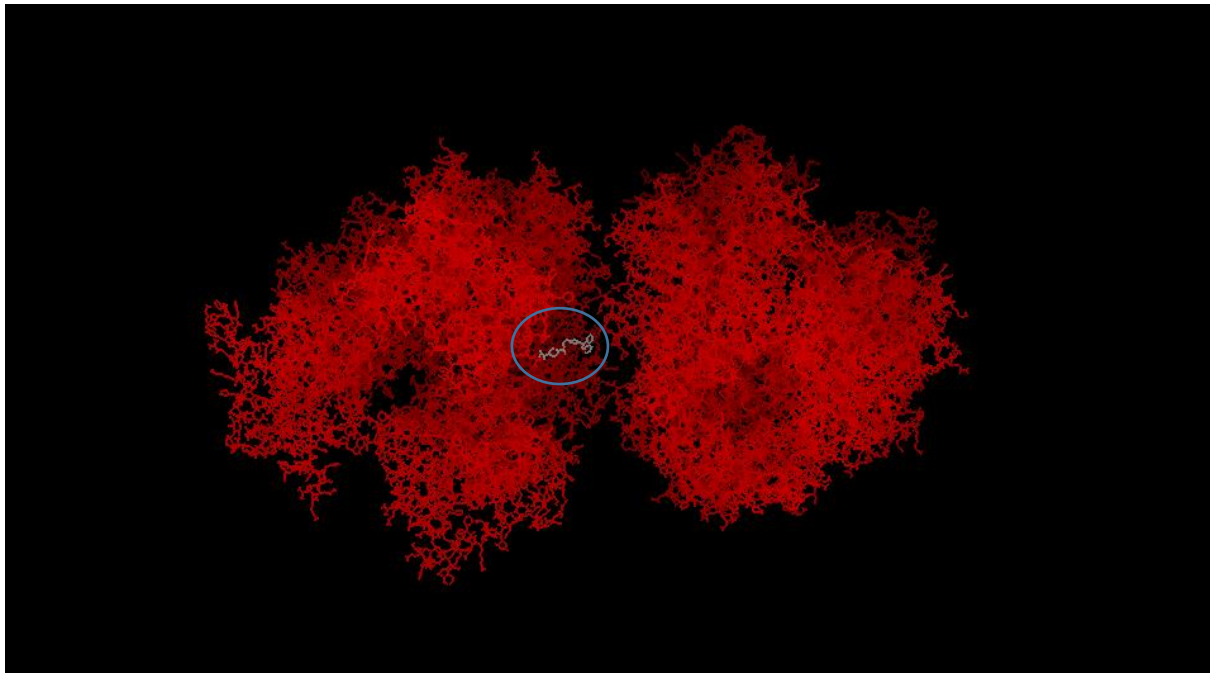


Figure 32 : L'amarrage moléculaire de la fexofénadine avec la RND d'*E.coli*.

Contrairement à la pompe d'efflux RND « 4ZIT », l'amarrage moléculaire entre la pompe d'efflux 7cz9 a donné 15 molécules qui ont un score d'affinité moins de **-8kcal/mol** avec un score extrême de **-10.7kcal/mol** pour Dihydroergotamine, **-9.2kcal/mol** pour itraconazole et le Flubendazole (antiparasitaire) avait un score de **-9.1kcal/mol**, ces résultats sont largement différents par rapport à l'autre protéine sachant qu'elles ont des structures très semblables.

La position de la liaison des médicaments bromocriptine avec la pompe d'efflux RND de *K.pneumoniae* « 7cz9 » supporte la probabilité que ces médicaments candidats pourraient bloquer le canal du transporteur.

On observe que le positionnement de la bromocriptine (inhibiteur de prolactine) est très centré et ferme l'ouverture par laquelle le médicament est transporté.

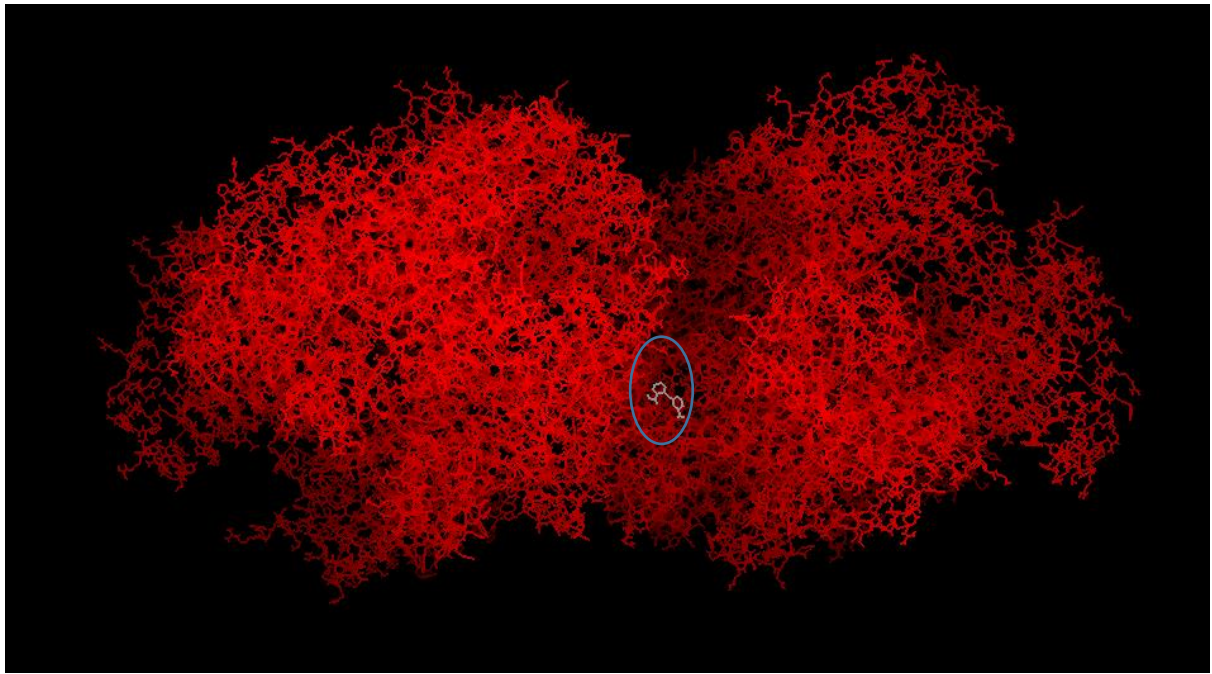


Figure 33 :L'amarrage moléculaire de l'acide niflumique avec la RND de *k.pneumoniae*.

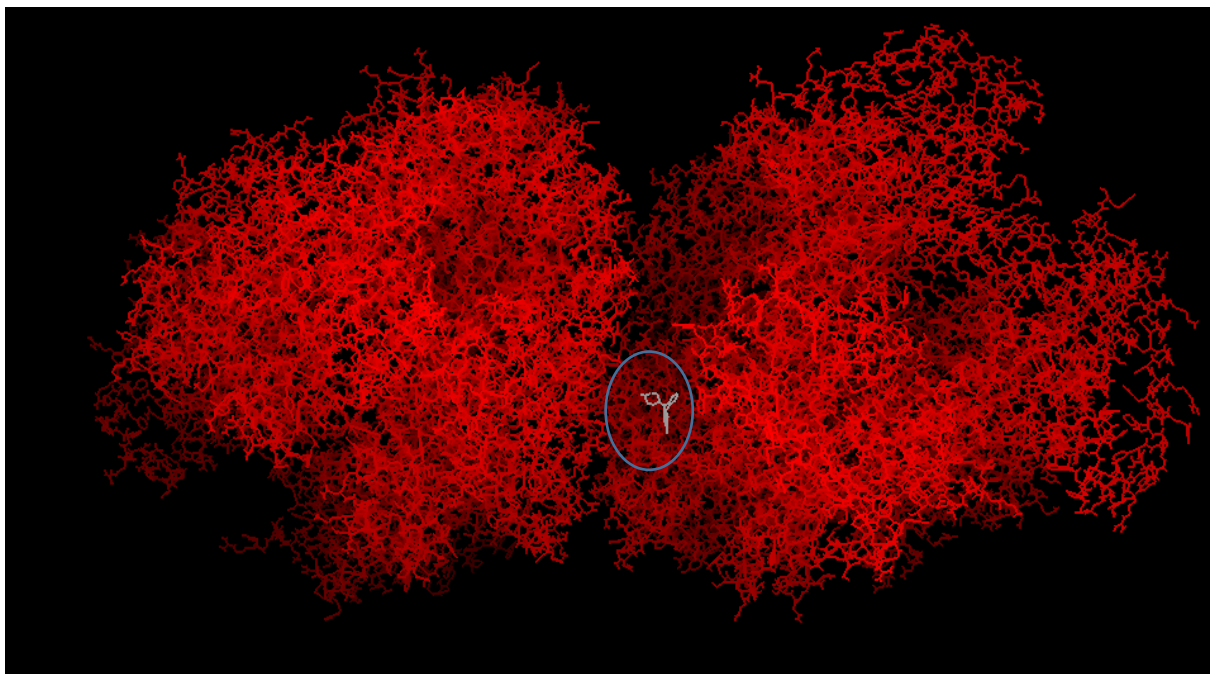


Figure 34 : L'amarrage moléculaire de la desloratadine avec la RND *k.pneumoniae*.

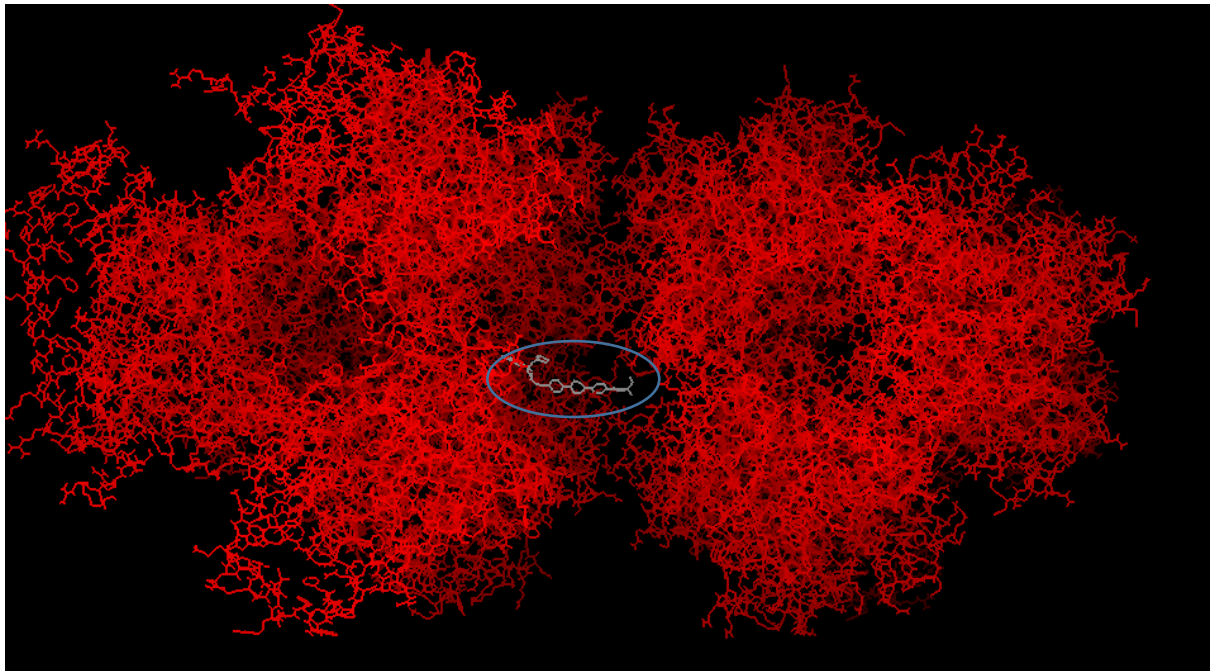


Figure 35 :L'amarrage moléculaire de l'itraconazole avec la RND de *K. pneumoniae*.

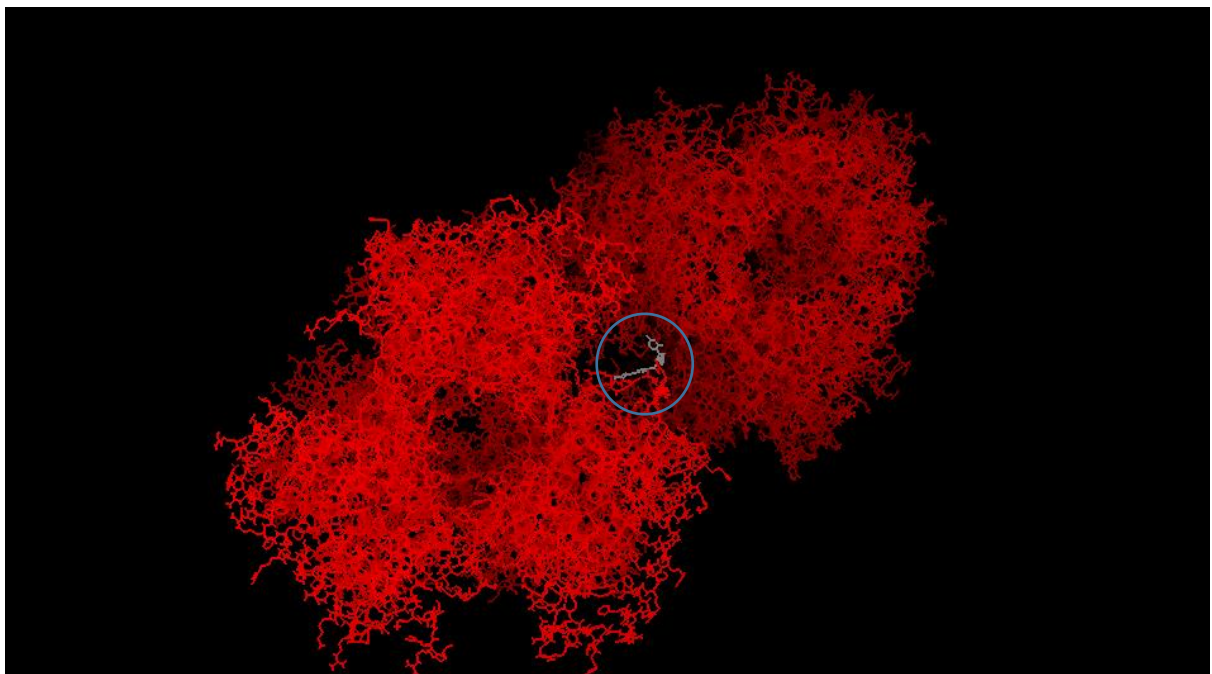


Figure 36 : L'amarrage moléculaire de la kétoconazole avec la RND de *K. pneumoniae*.

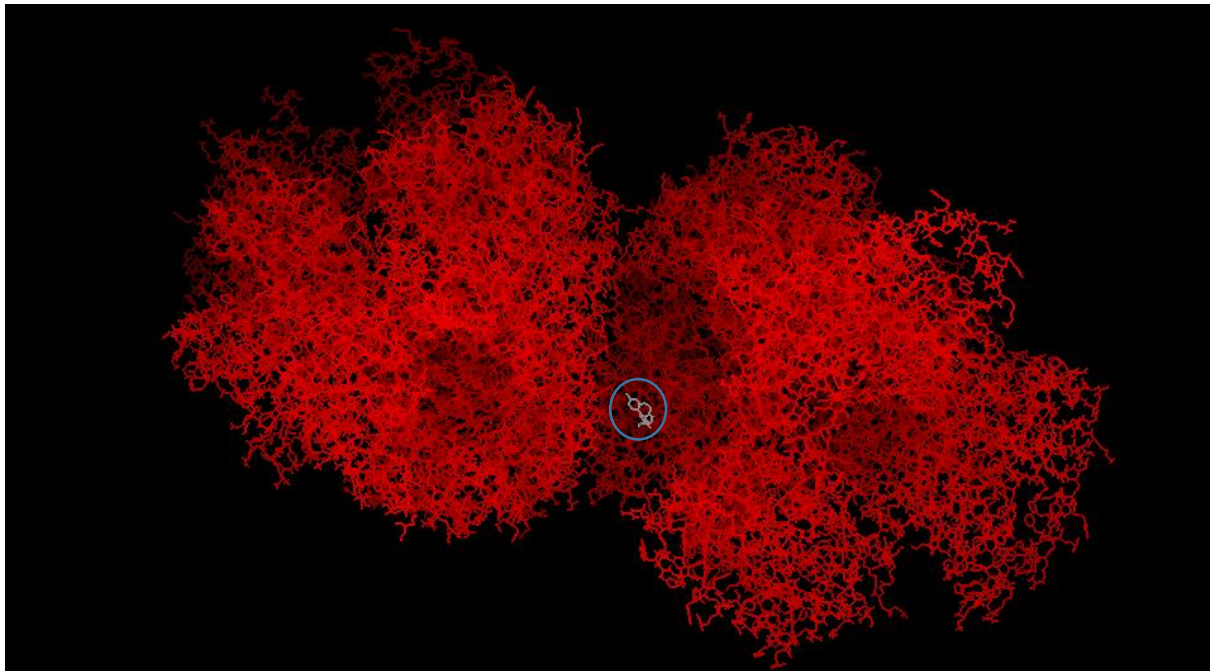


Figure 37 : L'amarrage moléculaire de la loratadine avec la RND de *K. pneumoniae*.

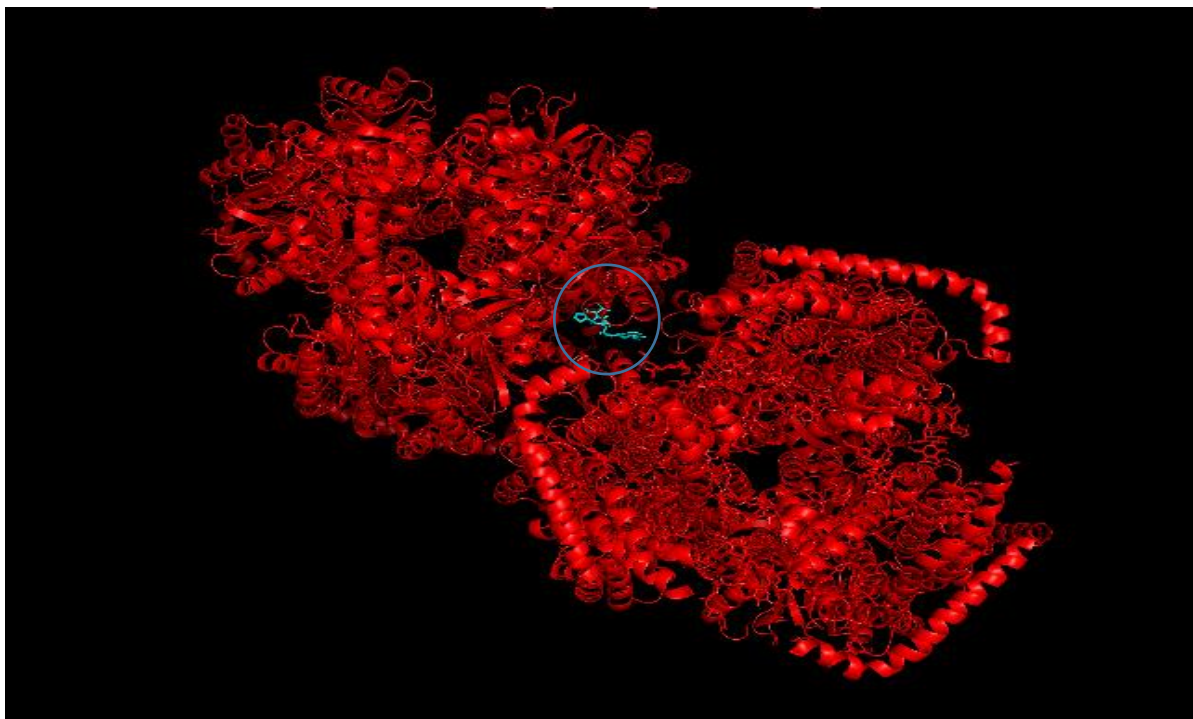


Figure 38 : L'amarrage moléculaire de la bromocriptine avec la RND de *K. pneumoniae*.

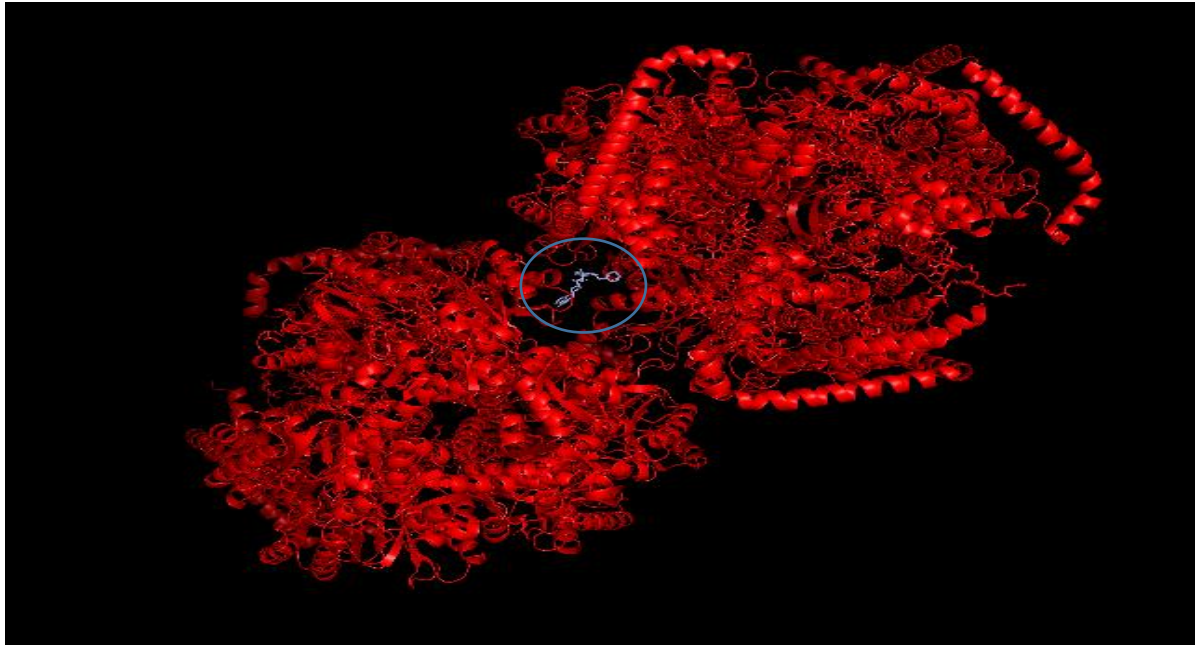


Figure 39 : L'amarrage moléculaire de la dihydroergotamine avec la RND de *K. pneumoniae*.

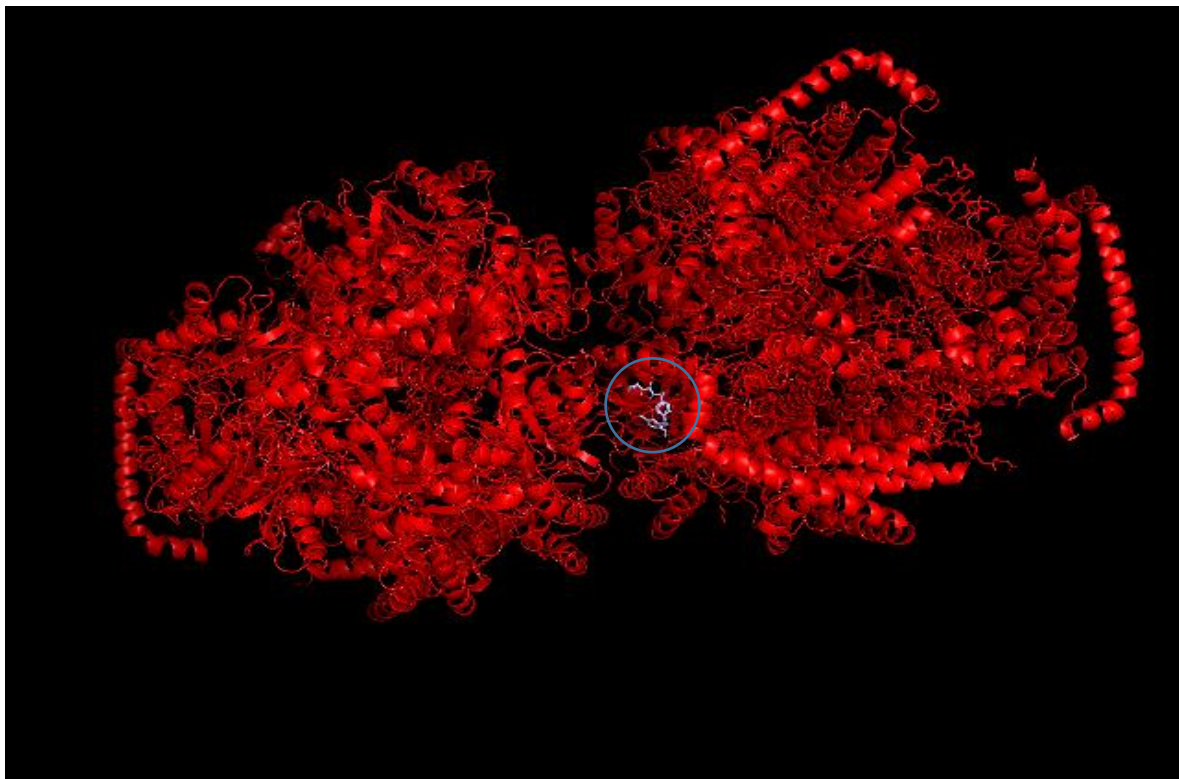


Figure 40 : L'amarrage moléculaire de la glyburide avec la RND *K. pneumoniae*.

- Les résultats de la prédiction sont très encourageants. Néanmoins, des essais *in vitro*, précliniques et cliniques restent indispensables pour prouver les résultats des prédictions *in silico*.

- Le médicament (le Dihydrogotamine) présente une affinité élevée pour toutes les protéines, il serait intéressant d'effectuer des tests complémentaires sur ce médicament.

4 Taux d'inhibition bactérienne :

Le choix des médicaments candidats pour l'expérimentation (partie *in vitro*) a été limité par plusieurs facteurs notamment :

- ✓ La disponibilité des médicaments sur le marché.
- ✓ La forme galénique du médicament.
- ✓ Le prix du médicament.

La figure n° 30 représente les taux d'inhibition de la croissance des deux souches bactériennes tests (*E. coli* et *K. pneumoniae*), par une collection de dix médicaments candidats appartenant à quatre classes thérapeutiques.

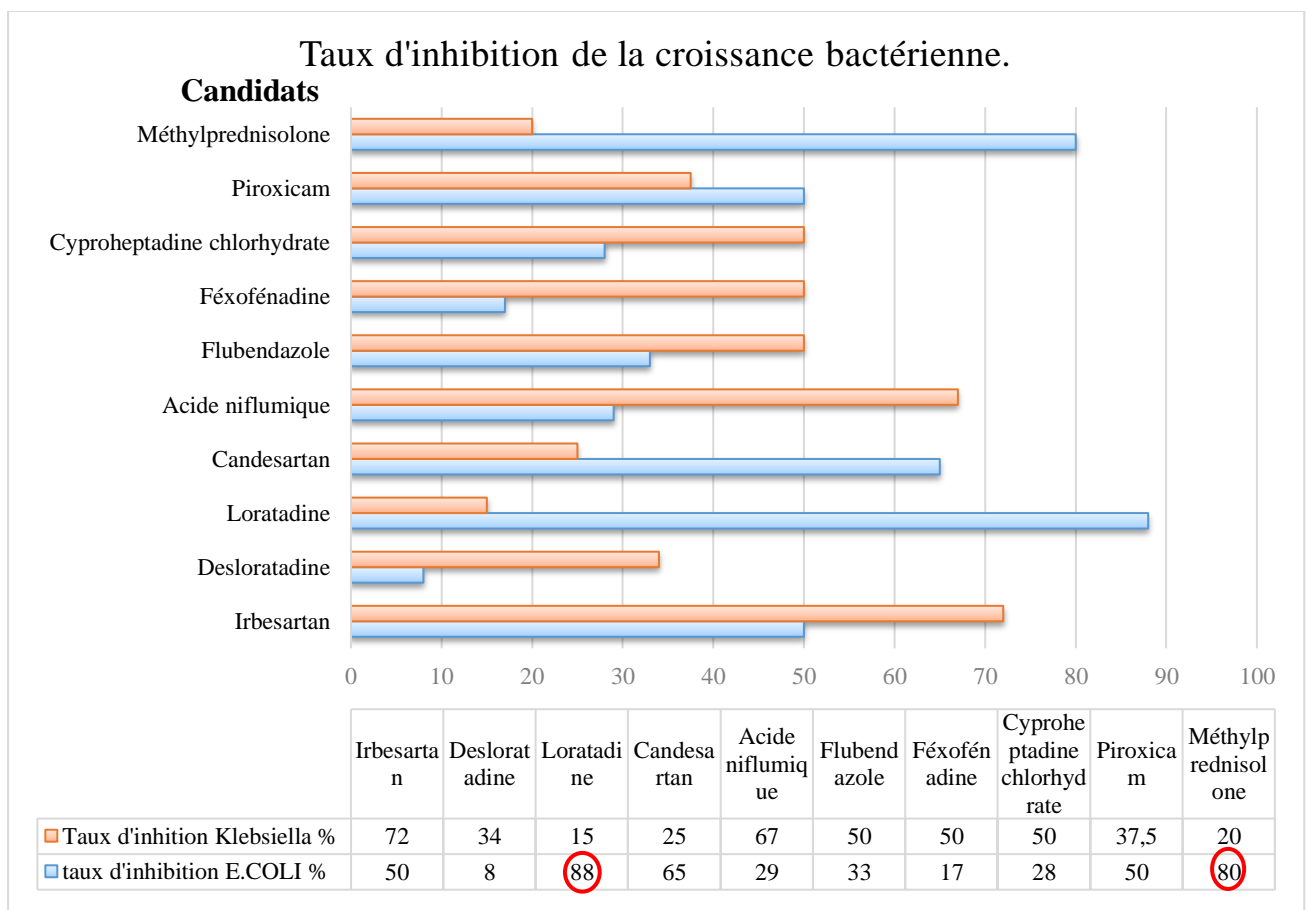


Figure 41 : Taux d'inhibitions de la croissance bactériennes.

Nos résultats montrent des taux d'inhibition très faibles à l'égard de *K. pneumoniae*. **80 %** des médicaments testés présentaient un taux d'inhibition inférieure ou égale à **50 %**.

20 % seulement des médicaments testés, ont présenté un taux d'inhibition supérieure à **50 %**.

En effet, l'**acide niflumique** ; un anti-inflammatoire non stéroïdien, utilisé pour le traitement de rhumatismes ; arthroses ; tendinites superficielles et entorses notamment et l'**irbesartan** ; un antagoniste de récepteur de l'angiotensine II, utilisé pour le traitement de l'hypertension artérielle chez les patients atteints du diabète type 2, présentent des taux d'inhibition à l'égard de *K. pneumoniae* de l'ordre de **67 %** et **72 %** respectivement.

Des taux d'inhibition aussi faibles à l'égard d'*E. Coli* ont été enregistrés. **70%** des médicaments testés ont présenté un taux d'inhibition inférieure ou égale à **50 %**.

30% uniquement des médicaments testés ont un taux d'inhibition supérieur à **50 %**. **Candesartan**; un antagoniste de récepteur de l'angiotensine II, utilisé pour le traitement de l'hypertension et l'insuffisance cardiaque a présenté un taux d'inhibition de **65 %**. Tandis que **Méthylprednisolone** ; un Anti-inflammatoire stéroïdien utilisé dans le traitement de la sclérose en plaques et la polyarthrite rhumatoïde et **Loratadine** ; un antihistaminique non sédatif utilisé pour le traitement de la rhinite allergique et l'urticaire ont présenté des taux d'inhibition de l'ordre de **80 %** et **88 %** respectivement. Néanmoins, ça reste insuffisant pour pouvoir les sélectionner car inférieurs au seuil de **90 %**.

Une étude de (**Yu et al., 2022**) par la méthode de microdilution sur des BMR gram-négative à révéler que deux médicaments non antibiotiques présentaient un grand effet antibactérien sur des souches multirésistantes d'*Escherichia coli* et *klebsiellapneumoniae*. Il s'agit de l'**Auranofin** utilisé pour traiter la polyarthrite rhumatoïde et du **Pentamidine** ; un anti-protozoaire.

L'expérience de la combinaison de ses deux médicaments non antibiotiques, montre que cette association a un effet bactéricide sur *E.coli* et *K. Pneumoniae*, l'étude du mécanisme affirme que le **Pentamidine** augmente la perméabilité membranaire conduisant à l'absorption cellulaire accrue de l'**Auranofine** par les bactéries Gram-négatives.

Des expériences réalisées par (**Zheng et al., 2022**) arrivent à la conclusion que le **loratadine** inhibe la synthèse des facteurs de virulence à une concentration de **25 umol/l**, bloquant donc la synthèse des biofilms chez la bactérie *Staphylococcus aureus*. En comparant cela avec nos résultats (**88% taux d'inhibition de la loratadine utilisé à la dose de**

10µmol/l) on pourrait suggérer que des concentrations plus élevées de la loratadine auraient probablement donné des résultats meilleurs vis-à-vis de nos souches tests. **En 2022, Jampileka** montré dans son étude que le **Cyproheptadine** ; un antihistaminique utilisé dans la prise en charge de manifestations allergiques, interagit avec la membrane bactérienne de : *S.aureus, S. epidermidis, E. faecium, K. pneumoniae* et *E.coli*.

De plus **Le Piroxicam** ; un inhibiteur de cox1, cause une lésion de la membrane cytoplasmique et empêche la réparation de la membrane bactérienne, ce qui aboutit à l'éradication du biofilm préformé chez *E. Coli*, additif avec les tétracyclines (**Jampilek, 2022**).

Selon Rampelotto et al (2018), l'atrovastatine ; une hypolipidémie de la famille des statines, testé *in vitro* sur *Klebsiella pneumoniae* et *E. coli* a des propriétés cytotoxiques en faisant des ruptures dans la membrane.

Depuis le début de ce siècle, très peu d'antibiotique ont été mis sur le marché. Parallèlement, L'émergence de résistances, en particulier celles des bactéries à Gram négatif, s'accélère pour devenir selon l'OMS une véritable « pandémie mondiale » dans les années à venir. Le repositionnement moléculaire consiste à tester un médicament pour une maladie différente de celle pour laquelle il avait été développé initialement. La panoplie de molécules génériques (tombées dans le domaine public) constitue dans ce contexte, une mine d'or.

Notre travail est divisé en deux parties indépendantes. La première partie est une étude *in silico* da laquelle nous avons testé par moyens informatiques cent neuf médicaments génériques choisis soigneusement parmi les médicaments les plus surs, ayant le moins d'effets secondaires possibles. Dans la deuxième partie, nous avons testé *in vitro* de manière empirique et selon nos capacités dix médicaments contre deux bactéries BMR.

Nos résultats sont très encourageants car les scores d'affinité reflètent une grande affinité à l'égard des protéines cibles. Néanmoins, un test *in vitro* reste obligatoire pour confirmer ces résultats en ciblant des BMR par les médicaments candidats en association avec les antibiotiques de la famille des bêta-lactamines et des quinolones.

Les résultats de la partie *in vitro* ne nous permettent pas de sélectionner des médicaments candidats car les taux d'inhibition n'ont pas atteint le seuil retenu de 90%.

A la lumière de ces résultats, nous proposons les perspectives suivantes :

- Tester un nombre plus considérable de molécules médicamenteuses *insilico* comme *in vitro*, car il est clair que plus on teste plus on augmente la chance de trouver des molécules intéressantes ;
- Tester *in vitro* de manière automatique, tout médicament candidat présentant un score d'affinité remarquable dans l'étude *in silico* ;
- Augmenter les concentrations des médicaments candidats testés *in vitro* tout en respectant les doses limites admissibles de chaque médicament.

III. Les références :

- Ababou, A., & Koronakis, V. (2016). Structures of Gate Loop Variants of the AcrB Drug Efflux Pump Bound by Erythromycin Substrate. *PLoS ONE*, *11*(7), e0159154. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159154>
- Ankri, J. (1999). *tente d'établir des liens de causalité entre prise de médicament et effets secondaires. Les méthodes de l'épidémiologie sont utilisées à cette fin. 2.*
- Begaud, B., Maurain, C., Tabuteau, D., Lucet, J.-C., & Monnet, D.-L. (2010). *Cadre juridique du bon usage des antibiotiques.* 312.
- Bharatham, N., Bhowmik, P., Aoki, M., Okada, U., Sharma, S., Yamashita, E., Shanbhag, A. P., Rajagopal, S., Thomas, T., Sarma, M., Narjari, R., Nagaraj, S., Ramachandran, V., Katagihallimath, N., Datta, S., & Murakami, S. (2021). Structure and function relationship of Oqx B efflux pump from *Klebsiella pneumoniae*. *Nature Communications*, *12*, 5400. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25679-0>
- Cécile, P. (2018). *Les médicaments génériques et biosimilaires.*
- Commissioner, O. of the. (2020, février 20). *The Drug Development Process.* FDA; FDA. <https://www.fda.gov/patients/learn-about-drug-and-device-approvals/drug-development-process>
- Etienne, N. (2007). *Copies conformes, comportements conformes ? Les patients français face au choix des médicaments génériques.* 17.
- Hua, Y., Dai, X., Xu, Y., Xing, G., Liu, H., Lu, T., Chen, Y., & Zhang, Y. (2022). Drug repositioning : Progress and challenges in drug discovery for various diseases. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *234*, 114239. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114239>
- Jafaripour, S. S., Gharaghani, S., Nazarshodeh, E., Haider, S., & Saboury, A. A. (2020). In silico drug repositioning of FDA-approved drugs to predict new inhibitors for alpha-synuclein aggregation. *Computational Biology and Chemistry*, *88*, 107308. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2020.107308>
- Jampilek, J. (2022). Drug repurposing to overcome microbial resistance. *Drug Discovery Today*, *27*(7), 2028-2041. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2022.05.006>
- JUNOD, V. (2006). *Les médicaments génériques au regard de la LAMal.* 396-406.
- Krimm, I. (2015). Le criblage de fragments : Une voie prometteuse pour la conception de médicaments. *médecine/sciences*, *31*(2), 197-202. <https://doi.org/10.1051/medsci/20153102017>
- Langedijk, J., Mantel-Teeuwisse, A. K., Slijkerman, D. S., & Schutjens, M.-H. D. B. (2015). Drug repositioning and repurposing : Terminology and definitions in literature. *Drug Discovery Today*, *20*(8), 1027-1034. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2015.05.001>
- Magiorakos, A.-P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., & Monnet, D. L. (2012).

Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria : An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), 268-281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>

Marion, B. (2014). *L'ÉVALUATION DU RAPPORT BÉNÉFICE/RISQUE DES MÉDICAMENTS EN EUROPE*.

marrie, khadija. (2019). *Stratégie actuelle de lutte contre l'antibiorésistance*.

Mollet, C. (2017). *Identification et caractérisations physico-chimiques et pharmacologiques de nouvelles molécules bioactives isolées à partir de venins d'animaux : Exemple des peptides antimicrobiens*.

Montastruc, J.-L., Tillement, J.-P., Bontoux, D., Bounhoure, J.-P., Bouvenot, G., Buffet, C., Delaveau, P., Eléfant, E., Giroud, J.-P., Gonthier, R., Goullé, J.-P., Jaillon, P., Joly, P., Juillet, Y., Lhermitte, M., Menkès, C.-J., Montastruc, J.-L., Queneau, P., Safavian, A. A., ... Doucet, J. (2012). Pharmacovigilance : Actualités et perspectives. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*, 196(8), 1709-1720. [https://doi.org/10.1016/S0001-4079\(19\)31695-4](https://doi.org/10.1016/S0001-4079(19)31695-4)

MULLER, A. (2017). *BON USAGE DES ANTIBIOTIQUES : RESULTATS D' ACTIONS DANS DIFFERENTS TYPES D'ETABLISSEMENTS DE SANTE*.

neori, J. (2019). *L'HISTOIRE DE LA PHARMACIE*. 80.

Ngan, D. K., Xu, T., Xia, M., Zheng, W., & Huang, R. (2022). Repurposing drugs as COVID-19 therapies : A toxicity evaluation. *Drug Discovery Today*, S1359644622001325. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2022.04.001>

OMS. (2020, octobre 26). *Résistance aux antimicrobiens*. <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>

PEYCLIT, lucie. (2020). *Repositionnement de molécules médicamenteuses dans la lutte contre les bactéries multi-résistantes*.

Punekar, M., Kshirsagar, M., Tellapragada, C., & Patil, K. (2022). Repurposing of antiviral drugs for COVID-19 and impact of repurposed drugs on the nervous system. *Microbial Pathogenesis*, 168, 105608. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105608>

Seeliger, D., & de Groot, B. L. (2010). Ligand docking and binding site analysis with PyMOL and Autodock/Vina. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 24(5), 417-422. <https://doi.org/10.1007/s10822-010-9352-6>

Serreau, D. R. (2012). *Les différentes étapes du développement d'un médicament— Organisation de la recherche clinique en France*. 39.

Sunjeev, K., & Ravi, das. (2018). Repurposing drugs to treat disturbances of learning and memory in neuropsychiatric disorders. *Clinical Pharmacist*, 5. <https://doi.org/10.1211/CP.2018.20204477>

Veysiere, A. (2019). *La résistance aux antibiotiques des bactéries les plus communément rencontrées dans les infections communautaires état des lieux en 2019*. 107.

Yu, Y., Zhao, H., Lin, J., Li, Z., Tian, G., Yang, Y. Y., Yuan, P., & Ding, X. (2022). Repurposing Non-Antibiotic Drugs Auranofin and Pentamidine in Combination to Combat Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 59(5), 106582. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2022.106582>

Zheng, J., Shang, Y., Wu, Y., Zhao, Y., Chen, Z., Lin, Z., Li, P., Sun, X., Xu, G., Wen, Z., Chen, J., Wang, Y., Wang, Z., Xiong, Y., Deng, Q., Qu, D., & Yu, Z. (2022). Loratadine inhibits *Staphylococcus aureus* virulence and biofilm formation. *IScience*, 25(2), 103731. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.103731>

(Développement & santé, Pascale Lesieur, Antibiotiques : mode d'action et mécanismes de résistance, 2019)
<https://devsante.org/articles/antibiotiques-modes-d-action-mecanismes-de-la-resistance>

IV. Les annexes:

Matériel utilisé

- ✚ Pipettes pasteurs.
- ✚ Ance de platine.
- ✚ Boîtes de pétries.
- ✚ Etuve réglée à 37°C.
- ✚ Bec bunsen.
- ✚ Bain marie.
- ✚ Tubes à essai.
- ✚ Falcon stérile.
- ✚ Seringue.
- ✚ Pince métallique.
- ✚ Spectrophotomètre

Les milieux Utilisés

Milieux de culture :

- ✚ Gélose TSA
- ✚ Gélose Muller Hinton
- ✚ Bouillon Muller Hinton (BMH).

Les produits liquides

- ✚ Eau distillée stérile
- ✚ Eau physiologique stérile.

Préparation de milieux de culture :

Le milieu TSA gélose :

- Peser 10 g de TSA dans la balance avec 250 ml d'eau distillé.
- Verser dans un bécher la quantité en agitant et en chauffant parallèlement.
- Préparer l'autoclave pour la stérilisation des flacons.
- Vider l'autoclave puis verser 1l d'eau.
- Laisser les flacons se stérilise pendant 20 minutes à 120 °C, 1 bar.

Préparation du Mueller Hinton :

- Peser 19 g de la poudre de MH avec 500 ml d'eau distillé.
- Agiter le mélange en parallèle avec l'échauffement jusqu'au l'ébullition.
- Verser dans les flacons.
- Placer les flacons dans l'autoclave pour la stérilisation pendant 20 minutes à 120 ° C à 1 BAR.
- Agiter les flacons un peu après la stérilisation et les laisser refroidir.

Préparation de bouillon Mueller Hinton :

- Peser 17.5 g/l d'hydrolysate de caséine.
- Peser 1.5 g/l d'amidon du maïs.
- Extrait de bœuf (3g/l).
- 20 – 25 mg/l du calcium.
- 10 – 12.5 mg/l du magnésium.

Dissoudre les poudres dans 1 litre d'eau distillé et agiter jusque qu'ils soient homogène, puis la stériliser dans l'autoclave pendant 15 minute à 121° C.

Annexe 3 : Les médicaments testés et leurs classes dans la partie in silico.

Classe thérapeutique	Principe actif	Classe thérapeutique	Médicaments
Antiviraux	<ul style="list-style-type: none">• -Aciclovir.• -Valaciclovir.• -Remdesivir.• -Lamivudine.• -Entécavir.• -Névirapine.• -Oseltamivir.• -Ribavirine.• -Sofosbuvir.• -Evafirenz.• -Abacavir (contre VIH).	Anxiolytique	<ul style="list-style-type: none">• Bromazépan• Lorazépan• Hydroxyzine• Méprobamate• Diazépan• Etifoxin• Thioridazine• Amsulpiride
Annexe 3 : Les médicaments testés et leurs classes dans la partie in silico (suite).			
Antihistaminique	<ul style="list-style-type: none">• Loratadine.• Cétirizinedichlorhydrate.• Desloratadine.• Féxofénadine.• Dexchlorphéniramine maléate.• Doxylamine.• Méquitazine.• Olopatadine.• Cyproheptadine chlorhydrate.• Dexchlorpheniramine.• Méthylprednisolone.	Antidépresseurs	<ul style="list-style-type: none">• Paroxetine• Amitriptyline• Clomipramine• Fluoxetine• Mianserin• Escitalopram• Duloxetine• Maprotiline• Citalopram• Haloperidol• Sulpiride• Olanzapine• Loxapine

Antiparasitaire	<ul style="list-style-type: none"> • Métronidazole. • Albendazole. • Flubendazole. • Niclosamide. • Tinidazole. 	Antimigraineux	<ul style="list-style-type: none"> • Sumatriptan • Dihydroergotamine • Pizotifene • Eletriptan • Citicoline
Antifongique	<ul style="list-style-type: none"> • Fluconazole. • Grésiofulvine. • Terbinafine. • Kétoconazole. • Itraconazole. • Miconazole. • Ciclopirox. • Clotrimazole. • Econazole. 	Anti-épilepsie	<ul style="list-style-type: none"> • Lamotrigine • Phénobarbital • Carbamazepine • Levetiracetam • Clonazepam • Topiramate • Sumatriptan • Acide valporique
Antalgique	<ul style="list-style-type: none"> • Paracétamol. • Propoxyphene • Phénytoin • Oxycodone • Buprenorphine • tramadol • Codéine 	Antiparkinsonien	<ul style="list-style-type: none"> • Entacapone • Bromocriptine • Levodopa
Anti-inflammatoire	<ul style="list-style-type: none"> • Bétaméthasone. • Ibuprofene. • Diclofénac. • Acide méfinamique. • Méloxicam. • Naproxene. • Acide niflumique. • Piroxicam. • Acide acétylsalicylique. 	Antihypertenseurs	<ul style="list-style-type: none"> • Captopril. • Losartan. • Méthyl dopa. • Irbesartan. • Candesartan. • Bisoprolol. • Ramipril.
Antipaludéen	<ul style="list-style-type: none"> • Chloroquine. 	Antidiabétique	<ul style="list-style-type: none"> • Acarbose • Pioglitazone • Metformin • Glicazide
Antagoniste	<ul style="list-style-type: none"> • Amlodipine. • Clopidogrel. 	Others	<ul style="list-style-type: none"> • Oméprazole. • Malathion.
Antimalaria	<ul style="list-style-type: none"> • Hydroxychloroquine. 		