

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Amar TELIDJI Laghouat

جامعة عمار ثليجي - الأغواط

Faculté des Sciences

كلية العلوم

Département de Biologie

قسم البيولوجيا



MEMOIRE

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Filière : Sciences biologiques

Option : Biochimie appliquée

Thème

***Détermination de l'activité biologique de quelques
cocristaux pharmaceutiques***

Présenté par : *Helifa Fatima Zohra.
Lamri Khadidja Rym.
Medani Hadil.*

Devant le jury composé de :

Mme. BENTAHAR FATIHA
Mme. BENCHIKH IMEN
Mme. ALLAL FARIDA

MAA (Université de Laghouat)
MCA (Université de Laghouat)
MCA (Université de Laghouat)

Présidente
Examinatrice
Rapporteur

Année universitaire : 2022/2023.

ملخص

تهدف هذه الدراسة إلى تحسين الخواص الفيزيائية وكيميائية وزيادة النشاط المضاد للبكتيريا للمضاد الحيوي المستخدم على نطاق واسع في علاج الأمراض المعدية الناجمة عن البكتيريا اللاهوائية. المضاد الحيوي المشار إليه هو Métronidazole، وتم تحضير بلوراته من خلال مزجه مع خمسة مركبات كيميائية و هي Paracetamol و Nicotinamide و L-Leucine و L-Proline و L-Arginine. تم دراسة خصائص البلورات التي تم تحضيرها بواسطة الطحن الرطب باستخدام DSC و XRD و MEB و FTIR واختبارها ضد أربع سلالات من البكتيريا الهوائية واللاهوائية وهي *Staphylococcus aureus* ، *Klebsiella pneumoniae* ، *Pseudomonas aeruginosa* ، *Echerichia coli*. تتراوح القيم التي تم الحصول عليها من أقطار منطقة التثبيط لمختلف الأنشطة المضادة للبكتيريا للعوامل الخمسة المضادة للبكتيريا بين 6.7 و 13.42 مم. تتراوح التراكيز الحدية للتثبيط التي تم تقييمها في هذه الدراسة بين 0.38 و 3.09 ملغ/مل. تظهر السلالات البكتيرية المختبرة حساسية متوسطة إلى قوية. يلاحظ تأثير التآزر البارز.

الكلمات المفتاحية : Métronidazole، مركبات كيميائية ، بلورات، نشاط مضاد للبكتيريا، CMI، CMB.

Résumé

La présente étude vise à améliorer les propriétés physico-chimiques et à augmenter l'activité antibactérienne, d'un antibiotique d'utilisation très répandue dans le traitement des maladies infectieuses causées par des bactéries anaérobies. L'antibiotique dont il s'agit est le métronidazole, ce dernier a subi une cocrystallisation par sa combinaison avec cinq coformeurs à savoir, le Paracétamol, la Nicotinamide, la L-Leucine, la L-Proline et la L-Arginine. Les cocristaux synthétisés par broyage humide ont été caractérisés par DSC, XRD, MEB et FTIR et testés contre quatre souches bactériennes aérobies et anaérobies, il s'agit de l'*Escherichia coli*, du *Pseudomonas aeruginosa*, de la *Klebsiella pneumoniae* et du *Staphylococcus aureus*. Les valeurs obtenues des diamètres de zone d'inhibition des différentes activités antibactériennes des cinq agents antibactériens varient entre 6.7 et 13.42 mm. Les concentrations minimales d'inhibition évaluées dans cette étude varient entre 0.38 et 3.09 mg/ml. Les souches bactériennes testées sont sensibles à moyennement sensibles. Un effet de synergie est prépondérant.

Mots clés : Métronidazole, Coformeur, Cocristaux, Activité antibactérienne, CMI, CMB.

Summary

This study aims to improve the physico-chemical properties and increase the antibacterial activity of an antibiotic widely used in the treatment of infectious diseases caused by anaerobic bacteria. The antibiotic in question is metronidazole, which underwent a co-crystallisation by its combination with five coformers namely: Paracetamol, Nicotinamide, L-Leucine, L-Proline and L-Arginine. The co-crystals synthesized by wet grinding were characterized by DSC, XRD, MEB and FTIR and tested against four aerobic and anaerobic bacterial strains: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*. The values obtained from the inhibition zone diameters of the different antibacterial activities of the five antibacterial agents vary between 6.7 and 13.42 mm. The minimum inhibition concentrations evaluated in this study vary between 0.38 and 3.09 mg/ml. The bacterial strains tested are sensitive to moderately sensitive. A synergistic effect is predominant.

Keywords: Metronidazole, Coformer, Cocristaux, Antibacterial activity, CMI, CMB.

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux qui nous a donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire.

Tout d'abord, ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu voir le jour sans l'aide et l'encadrement de Madame ALLAL Farida, nous la remercions pour la qualité de son encadrement exceptionnel, pour sa patience, sa rigueur et sa disponibilité durant notre préparation de ce travail de recherche.

Nous tenons à exprimer nos gratitude, nos profonds respects et nos remerciements aux membres du jury : Mme BENTAHAR Fatiha et Mme BENCHIKH Imen qui nous ont fait honneur en acceptant de faire partie de ce jury et d'examiner ce travail.

Nous remercions également tous les enseignants du Département de biologie qui ont contribué à notre formation durant notre cycle d'étude.

D'autre part, nous remercions les ingénieurs du laboratoire du Département de biologie.

Et finalement un grand merci à tous ceux qui nous ont aidés de loin ou de près pour accomplir ce travail.

Dédicaces

Avec l'expression de ma reconnaissance, je dédie ce modeste travail :

À ma première référence, à la lumière qui éclaire mon chemin, à celui qui m'a donné et continue de me donner sans limite. Mon précieux offre du dieu, mon cher père
Mahmoud

À celle dont le cœur m'a vu avant ses yeux, et qui m'a embrassé dans ses entrailles avant ses mains, à mon arbre qui ne se flétrit pas, à l'ombre qui m'abrite en tout temps, À cette source de tendresse, de patience et de générosité, À ma mère Amel

Aux bougies qui éclairent mon chemin, à mes chers frères Mohamed, Yahia et Ammar, pour votre amour inconditionnel et votre soutien sans faille

A la mémoire de mes grands-parents

À ceux qui ont attendu ces moments pour être fiers de moi, à mes chers oncles et tantes

À mon trinôme Khadidja et Hadil avec qui j'ai vécu des beaux moments au cours de cette année

À toutes les personnes m'ayant consacré un moment pour m'aider, me conseiller et m'encourager

Helifa Fatima Zohra

Dédicaces

Tout d'abord, je tiens à remercier DIEU

Je dédie ce modeste travail à ceux qui, quels que soient les termes embrassés, je n'arriverais jamais à leur exprimer mon amour sincère.

A l'homme, mon précieux offre de dieu, ma réussite et tout mon respect : mon cher père Mohammed.

A la femme qui a souffert sans me laisser souffrir, qui n'a jamais dit non à mes exigences et qui n'a épargné aucun effort pour me rendre heureuse : mon adorable mère Dalila.

A ma chère sœur : Fatima Zohra et mon frère : Abdelmalek qui n'ont pas cessé de me conseiller, encourager et soutenir tout au long de mes études que Dieu les protège et leur offre la chance et le bonheur.

A mon petit frère : Amine qui sait toujours comment procurer la joie et le bonheur pour toute la famille.

A ma grand-mère, mes oncles et mes tantes que Dieu leur donne une longue et joyeuse vie.

A tous ceux qui m'aiment et que j'aime, merci pour leur amour et leurs encouragements.

Sans oublier mon trinôme Hadil et Fatima Zohra pour leur soutien moral, leur patience et leur compréhension tout au long de ce projet.

Lamri Khadidja Rym

Dédicaces

Avant tous, je remercie Dieu pour mon succès.

Du fond de mon cœur je dédie ce travail à tous ceux qui me sont chers

A MA FAMILLE

Que ce modeste travail soit l'expression de ma reconnaissance pour leur soutien moral qu'elle n'a cessé de prodiguer

A MES PROCHE AMIES RYM ET FATIMA ZOHRA

Pour l'amour et le respect qu'ils m'apportent, pour leurs aides, et leurs disponibilités

A tous mes amies qui m'ont toujours Encouragé et à qui je souhaite plus de succès.

A tous ceux que j'aime

Merci !

Medani Hadil

Table Des Matières

Résumé	
Remerciements	
Dédicaces	
Liste des Figures	
Liste des Tableaux	
Liste des schémas	
Liste des Abréviations	
Introduction	1

Synthèse bibliographique

I.1. Cocrystallisation	4
I.2. Cocristaux	4
I.3. Méthodes de préparation des cocristaux	7
I.4. Principe Actif	7
I.5. Coformeur	7
I.6. Bactéries	8
I.7. Antibiotiques	9
I.8. Mécanisme d'action du métronidazole	10
I.9 Activité antibactérienne des cocristaux	11
I.10 Travaux antérieurs	11

Partie expérimentale

II.1. Matériels et méthodes	13
II.1.1. Produits chimiques utilisés	13
II.1.2 Microorganismes testés	16
II.2. Méthode expérimentale	17

II.2.1. Synthèse des cocristaux par voie mécanique.....	17
II.2.1. Broyage assisté par liquide (LAG).....	17
II.3. Caractérisation des cocristaux.....	18
II .3.1 Calorimétrie différentielle à balayage DSC.....	18
II.3.2. Diffraction des rayons DRX	19
II.3.3. Microscopie électronique à balayage MEB	20
II.3.4 Infra-rouge a transformé de fourrier FTIR	21
II.4. Détermination de l'activité antibactérienne des cocristaux élaborés.....	22
II.4.1 Préparation des cocristaux dilués à 1/2, 1/5 et 1/10)	22
II.5. Etude de l'activité antibactérienne.....	23
II.5.1 Méthode de diffusion par disque.....	23
II.5.2. Préparation de la préculture.....	24
II.5.3. Préparation de la suspension bactérienne.....	24
II.5.4. Ensemencement.....	24
II.5.5. Préparation des disques.....	25
II.6. Méthode de micro dilution en milieu liquide.....	25
II.6.1 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	25
II.6.2 Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB).....	25
II.6.3 Préparation des microplaques.....	26
II.6.4 Révélation de l'activité antibactérienne par le chlorure d'Iodonitrotetrazoluim (INT).....	26

Résultats et discussion

III.1. Cocristaux synthétisés.....	28
III.2. Caractérisation.....	29
III.2.1. Calorimétrie différentielle à balayage (DSC).....	29
III.2.2. Analyse par DRX.....	30

III.2.3. Caractérisation des cocristaux synthétisés par microscopie électronique à balayage.....	30
III.2.4. Caractérisation par FTIR.....	32
III.3. Détermination de l'activité antibactérienne des cocristaux du métronidazole.....	34
III.3.1. Activité antibactérienne en milieu solide.....	34
III.3.1.1. Résultats du contrôle positif.....	34
III.3.1.2. Résultats du contrôle négatif.....	35
III.3.1.3. Résultats des tests de l'effet antibactérien des cinq cocristaux synthétisés.....	36
III.4. Détermination des concentrations minimales inhibitrice (CMI) et bactéricide (CMB).....	41
Conclusion.....	46

Références bibliographiques

Annexe

Listes des figures

Figure 1 Différentes formes solides d'ingrédients pharmaceutiques actifs.....	4
Figure 2 Représentation de la composition d'une bactérie.	8
Figure 3 Calcul des concentrations.....	18
Figure 4 Broyage assisté par liquide (LAG).....	18
Figure 5 DSC utilisé pour la mesure des flux de chaleur.	19
Figure 6 Diffractomètre de type EMPYREAN.	20
Figure 7 Microscope électronique à balayage environnemental de type Thermo Fischer SCIO2S.	21
Figure 8 Spectrophotomètre Jasco FT/IR-4200.	22
Figure 9 Dissolution des cocristaux dans du DMSO.....	23
Figure 10 Repiquage des souches bactériennes.....	24
Figure 11 Préparation des disques imbibés des cocristaux.....	25
Figure 12 Préparation des microplaques.	26
Figure 13 Etat physique et couleur des poudres des différents cocristaux synthétisés.	28
Figure 14 Thermogrammes de quelques cocristaux synthétisés.	29
Figure 15 Diffractogrammes du métronidazole et du cocrystal 2.	30
Figure 16 Morphologies de quelques cocristaux synthétisés et leurs corps purs.	31
Figure 17 Spectres infrarouges du métronidazole, de l'arginine, de la proline et des mélanges binaires métronidazole/arginine et métronidazole/proline.	32
Figure 18 Effet du contrôle positif sur les quatre souches bactériennes testées.....	34
Figure 19 Effet du contrôle négatif sur les quatre souches bactériennes testées.....	35
Figure 20 Histogrammes des résultats des antibiogrammes des cinq cocristaux vis-à-vis les souches bactériennes testées.....	36
Figure 21 Effet du cocrystal 3 pure sur les quatres souches bactériennes testées.....	40
Figure 22 Détermination des CMI et CMB des cinq cocristaux étudiés vis-à-vis des quatre souches.	42

Liste des tableaux

Tableau 1 Exemples de quelques propriétés améliorées de cocristaux de principes actifs.....	6
Tableau 2 Exemples de quelques médicaments et leur principe actif.....	6
Tableau 3 Produits chimiques utilisées et leurs propriétés.	14
Tableau 4 Les propriétés physico-chimiques des produits chimiques utilisés.	14
Tableau 5 Généralités sur les souches bactériennes utilisées.....	16
Tableau 6 Masses m1 et m2 du métronidazole et des différents coformeurs.	17
Tableau 7 Masses du principe actif pur et des cocristaux.	22
Tableau 8 Résultats des tests de l'activité antibactérienne obtenus par diffusion en milieu solide des cinq agents antibactériens synthétisés.	37
Tableau 9 CMI et CMB obtenues par la méthode de microdilution vis-à-vis les quatre souches bactériennes.	41

Liste des schémas

Schéma 1 Méthodes de préparation des cocristaux	7
Schéma 2 Diagramme récapitulatif de la procédure expérimentale suivie	13

Liste d'abréviation

ADN	l'acide désoxyribonucléique
API	Active pharmaceutical ingredient
Arg	Arginine
CMB	Concentration minimale bactéricide
CMI	Concentration minimale inhibitrice
DMSO	Dimethylsulfoxyde
DSC	Calorimétrie différentielle à balayage
EG	Ethyle gallate
FTIR	Infrarouge à transformé de fourrier
INT	Iodonitrotetrazoluim
LAG	Broyage assisté par liquide
MEB	Microscopie électronique à balayage
MH	Muller Hinton
MTZ	Métronidazole
Nic	Nicotinamide
PA	Principe actif
Pro	Proline
PXRD	Diffraction des rayons x sur poudre
PYR	Pyrogallol
SCB	Système de classification biopharmaceutique
UV	Rayons ultraviolets

Introduction

Les infections bactériennes sont causées par différents micro-organismes et sont la cause des maladies les plus fatales et des épidémies les plus répandues. Pour les traiter, de nombreux antibiotiques sont développés, malheureusement, l'abus de leur utilisation a engendré l'apparition d'une multirésistance bactérienne, devenue un problème de santé publique, notamment avec l'accroissement des maladies infectieuses difficiles à traiter. En contrepartie, la découverte et le développement de nouveaux antibiotiques a considérablement ralenti et les médicaments dont nous disposons actuellement deviennent de plus en plus inefficaces. Cet écart énorme entre les besoins thérapeutiques et le nombre réel des nouveaux médicaments préoccupe les chercheurs en galénique et les incite à trouver des stratégies innovantes pour combattre l'émergence des bactéries résistantes, visant ainsi, l'amélioration de l'efficacité thérapeutique via l'augmentation de la biodisponibilité du principe actif, la minimisation du risque d'émergence des souches résistantes et la prévention de la réinfection (**S. Yaghoubi et al,2021**).

Les stratégies les plus couramment utilisées pour améliorer l'effet thérapeutique et l'activité antibactérienne des principes actifs pharmaceutiques, consistent en l'exploration de leurs formes solides, notamment les polymorphes, les solvates/hydrates, les sels et les cocristaux. Parmi ces différentes approches envisagées pour remédier au problème de résistance bactérienne, la stratégie de cocrystallisation des antibiotiques avec des coformeurs apparaît comme une solution prometteuse pour l'amélioration des propriétés physico-chimiques, l'inhibition de la résistance et le renforcement de l'activité antibactérienne (**K Zheng et al, 2019**).

C'est dans ce contexte que ce travail de mémoire se situe, dont l'objectif principal est de contribuer à la recherche de solutions pour lutter contre la résistance bactérienne aux antibiotiques, à travers la cocrystallisation d'un principe actif d'utilisation répandue dans le traitement des infections anaérobies et dans le traitement des patients atteints d'infections causées par *Trichomonas*. Il s'agit du métronidazole, un antibiotique appartenant à la famille des 5-nitroimidazoles sous forme de cocrystal, composé d'une combinaison de l'antibiotique avec un coformeur, permettant l'amélioration de ses propriétés physico-chimiques, l'augmentation de sa solubilité et de son effet antibactérien et la restauration de la sensibilité bactérienne (**A Thayyil et al,2020**). Ainsi, le choix du coformeur repose sur sa structure chimique, la présence de groupements fonctionnels, donneurs et accepteurs de proton, capables d'établir des interactions intermoléculaires non covalentes, comme la liaison hydrogène, les forces de Van Der Waals et les interactions π - π (**M Singh et al,2023**). Les différents coformeurs choisis sont l'arginine, la proline, la leucine, le nicotinamide et le paracétamol.

Afin d'aborder l'ensemble de ces objectifs, ce mémoire a été divisé en trois chapitres :

Le premier chapitre présente une synthèse bibliographique, expliquant le concept de la cocrystallisation, ses avantages et quelques travaux cités dans la littérature ayant conduit à des résultats prometteurs dans le domaine de l'amélioration des propriétés physico-chimiques et de l'effet antibactérien des antibiotiques.

Le deuxième chapitre est dévolu à la description du matériel utilisé, les protocoles expérimentaux de synthèse et de caractérisation, effectués par diverses techniques à savoir, la calorimétrie différentielle à balayage (DSC), la diffraction des rayons x (XRD), la microscopie électronique à balayage (MEB) et l'infrarouge a transformé de fourrier (FTIR)

Le troisième chapitre traite les résultats de synthèse et d'évaluation de l'activité antibactérienne in vitro.

Les résultats les plus significatifs de ce travail ainsi que les éventuelles perspectives seront résumés dans la conclusion générale.

Synthèse bibliographique

L'administration par voie orale des médicaments est privilégiée en raison de ses nombreux avantages tels que, la facilité d'emploi, l'absence de douleur à l'administration, la réduction du risque infectieux et le coût de production, souvent moins élevé que pour d'autres types d'administration.

En revanche, les contraintes liées à la physiologie de cette voie, qui nécessite son passage à travers plusieurs barrières, tels que, la cavité buccale, l'estomac et l'intestin, engendrent divers problèmes lors des étapes pharmacocinétiques (**S. Aitipamula et al, 2012**). Ces problèmes sont liés à la possibilité de dégradation enzymatique du médicament, à la mauvaise solubilité, qui pose un grand problème, quant à sa dissolution, son absorption et par conséquent, sa biodisponibilité (**D. Bučar et al, 2013**). En effet, une bonne solubilité dans l'eau et les fluides du corps humain, est une condition indispensable pour qu'un principe actif soit thérapeutiquement efficace. Ce point est particulièrement crucial pour l'administration orale des médicaments. Cependant, les nouvelles molécules de principes actifs sont de plus en plus complexes et donc de moins en moins solubles et par conséquent, moins biodisponibles dans le flux sanguin.

Afin de répondre à cette problématique, il est indispensable aux chercheurs en galénique, d'évaluer toutes les possibilités d'amélioration de la solubilité et le développement de formulations appropriées, par le développement de nouvelles stratégies (**figure 1**). La 1^{ère} stratégie est basée sur des modifications physiques de l'état cristallin et la réduction de la taille des cristaux (**S. Aitipamula et al, 2012**).

Quant à la 2^{ème}, elle repose sur des modifications chimiques tels que, la formation de sels plus hydrosolubles à partir d'un principe actif peu hydrosoluble, la dispersion moléculaire du principe actif dans une matrice polymérique, le développement des nanoparticules, des micros et nano-émulsions, la formation de solvates et la formation de cocristaux et sur cette dernière approche que le présent travail se focalise (**J. Bauer et al, 2001**).

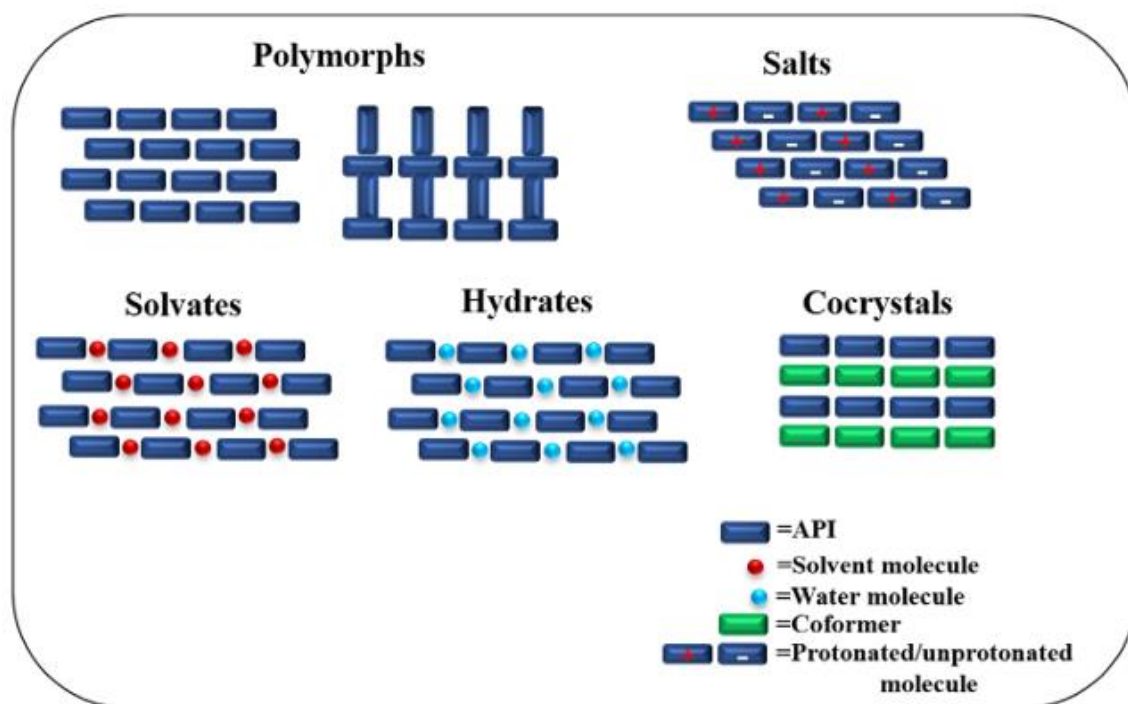


Figure 1. Différentes formes solides d'ingrédients pharmaceutiques actifs (E. Korotkova, et al 2014).

I.1. Cocrystallisation

En industrie pharmaceutique, la cocrystallisation d'un principe actif constitue en effet, une alternative à la formation de sels, étant donné qu'elle est susceptible de concerner un nombre de molécules plus important que les sels. La cocrystallisation est un procédé utile et original, quant à l'amélioration de la biodisponibilité et la vitesse de dissolution des médicaments. C'est l'interaction PA/coformeur, conduisant à une structure cristalline constituée d'au moins deux constituants (D. Bučar et al, 2013). Elle entraîne une modification des propriétés physico-chimiques des principes actifs, conduisant à un médicament d'activité moléculaire intrinsèquement stable (R. Banerjee et al, 2005).

I.2. Cocristaux

Les cocristaux sont des solides monophasés cristallins, composés de deux ou plusieurs composés moléculaires et ou ioniques, dans un rapport stœchiométrique dont ils ne sont ni solvates ni des sels (R. Banerjee et al, 2005). Ils possèdent une structure cristalline différente de celle des molécules de départ. Cette dernière affecte directement la solubilité d'un solide donné en solution, ce qui rend le médicament biodisponible dans le corps et peut par conséquent, être administré en utilisant des techniques conventionnelles (P. Billot et al, 2013).

Les cocristaux pharmaceutiques sont donc, composés d'un API et d'un agent de cocrystallisation (coformeur), généralement un petit composé organique, qui peut être un autre médicament ou une molécule non toxique (**Biscaia *et al.*, 2021**).

Les cocristaux sont maintenus par des hétérosynthèses supramoléculaires, se produisant entre les groupements fonctionnels, il s'agit en l'occurrence de l'acide carboxylique, l'azote aromatique, l'amide et l'alcool, par le biais des interactions de nature non covalente comme la liaison hydrogène, les forces de Van der Waals, les contacts lipophiles et les interactions $\pi \cdots \pi$ (**A. Thayyil *et al.*, 2020**).

Ci-dessous un tableau représentatif de quelques exemples de cocristaux et leurs propriétés améliorées (**Biscaia *et al.*, 2021**).

Tableau 1. Exemples de quelques propriétés améliorées de cocristaux de principes actifs.

Drug	Coformer	BCS	Improved Properties	Reference
Acyclovir	Fumaric acid	III	Solubility and permeability	Yan et al., 2013
Carbamazepine	Nicotinamide	II	Solubility	Rodríguez-Hornedo et al., 2006
Carbamazepine	17 Carboxylic Acids *	II	Solubility	Childs et al., 2008
Carbamazepine	Salicylic Acid, 4-Aminobenzoic Acid	II	Solubility	Bethune et al., 2009
Carbamazepine	Theophylline, Caffeine, Nicotinamide, Malonic Acid, Glutaric Acid, Saccharin, Oxalic Acid, Succinic Acid, Salicylic Acid	II	Solubility	Good and Rodríguez-Hornedo 2009
Carbamazepine	Succinic Acid	II	Solubility, Stability	Huang and Rodríguez-Hornedo 2011
Carbamazepine	Saccharin	II	Solubility	Alhalaweh et al., 2012
Carbamazepine	Saccharin, Salicylic Acid, 4-Aminobenzoic Acid monohydrate	II	Solubility	Lipert et al., 2016
Carbamazepine	Saccharin, Salicylic Acid	II	Solubility	Cao et al., 2018
Danazol	Hydroxybenzoic Acid, Vanillin	II	Solubility	Lipert et al., 2016
Ezetimibe	Methyl Paraben	II	Solubility	Sugandha et al., 2014
Gabapentin	3-Hydroxybenzoic Acid, 4-Hydroxybenzoic Acid, Salicylic Acid, 1-Hydroxy-2-Naphthoic Acid, Mandelic Acid, Tartaric Acid, Malic Acid, (+)-Camphoric Acid, Gallic Acid	II	Solubility, Stability	Sreenivas Reddy et al., 2009
Gabapentin-lactam	4-Hydroxybenzoic Acid, 4-Aminobenzoic Acid, Benzoic Acid, Gentisic Acid, Fumaric Acid	II	Solubility	Maheshwari et al., 2012
Indomethacin	Saccharin	II	Solubility	Alhalaweh et al., 2012
Indomethacin	Saccharin	II	Solubility	Lipert et al., 2016
Isoniazid	Resveratrol	I/III	No advantage	Rosa et al., 2019
Ketoconazole	Adipic Acid, Fumaric Acid, Succinic Acid	II	Solubility	Chen and Rodríguez-Hornedo 2018
Lamotrigine	Nicotinamide	II	Solubility	Cavanagh et al., 2018
Meloxicam	Salicylic Acid and Maleic Acid	II	Solubility	Machado 2016
6-Mercaptopurine	Isonicotinamide	II	Dissolution and Bioavailability	Wang et al., 2015
Moxifloxacin	4-hydroxybenzoic Acid	I	Solubility and Dissolution	Martínez-Alejo et al., 2014
Ofloxacin	Tartaric Acid Derivatives	I	Efficient separation of racemic compounds	He et al., 2018
Paracetamol	Oxalic Acid, 4-Bipyridine Cocrystal	I	Tableting properties	Ahmed et al., 2017

I.3. Méthodes de préparation des cocristaux

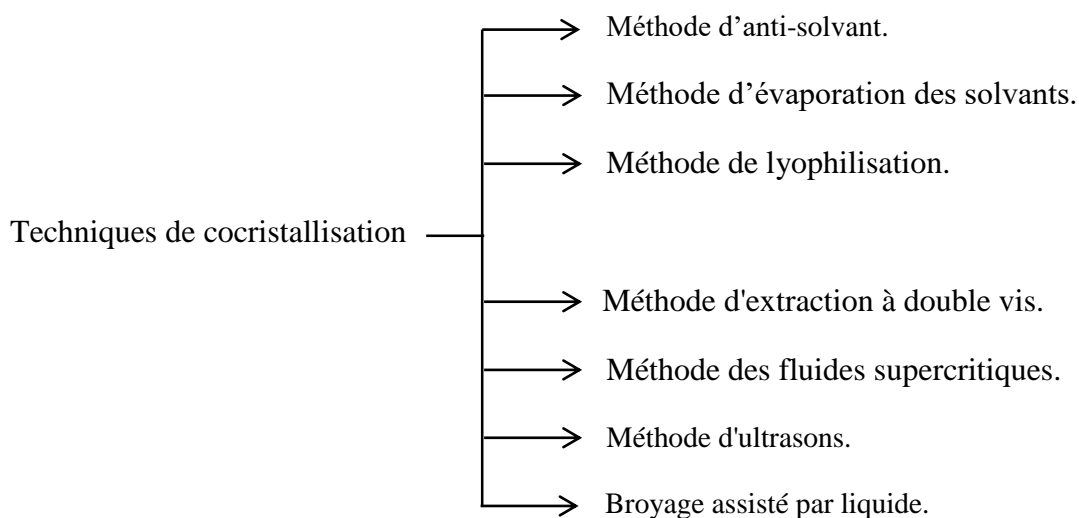


Schéma 1. Méthodes de préparation des cocristaux (M. Singh *et al*, 2023).

I.4. Principe Actif

Un principe actif est une substance comprise dans un produit médicamenteux. La plupart des principes actifs actuels sont cependant préparés, par synthèse chimique intégrale ou par semi-synthèse à partir de substances naturelles (J. Dangoumau *et al*, 2006).

Tableau 2. Exemples de quelques médicaments et leur principe actif (Original, 2023).

Nom du médicament	Principe(s) actif(s)
Efferalgan	Paracétamol
Flagyl	Métronidazole
Biofenac	Diclofenac sodique

I.5. Coformeur

Composant qui interagit non ioniquement avec l'API dans le réseau cristallin, qui n'est pas un solvant (y compris l'eau), et qui est généralement non volatile.

La sélection du coformeur joue un rôle important dans le choix des attributs cocristaux finaux. Les coformeurs ont la capacité de moduler la stabilité et la solubilité de l'API lorsqu'ils sont préparés comme cocrystal, en induisant des changements dans sa structure cristalline. Les facteurs tels que le type de groupement fonctionnel, le pKa, leur forme physique et leur taille

moléculaire doivent être pris en compte lors de la formation du cocrystal. L'utilité des produits chimiques comme coformeurs dépend de la capacité de liaison hydrogène des molécules avec l'API. Selon la règle d'Etter, la liaison hydrogène est formée si de bons donneurs et accepteurs de proton participent à la formation de cette liaison (M. Singh et al, 2023).

I.6. Bactéries

Les bactéries schématisées sur la (figure 2) sont des microorganismes unicellulaires. Elles sont capables de se reproduire de manière autonome à la différence des virus, qui ont besoin de détourner la machinerie d'une cellule pour se reproduire. La taille des bactéries varie de 1 à 10 μm , et elles pèsent de 10-12 grammes. Elles sont présentes partout.

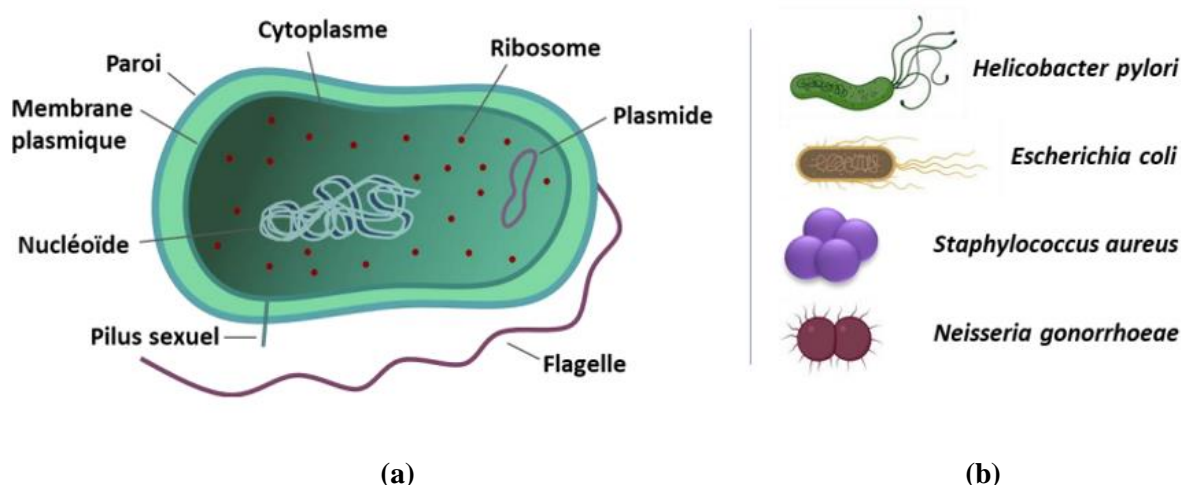


Figure 2. Représentation de la composition d'une bactérie (a). Représentation des différentes morphologies des bactéries les plus connues (b) (M.Bousekraoui, 2017).

En tant que procaryote, la structure de la cellule est simple. Le volume intérieur, appelé cytoplasme, est délimité par la membrane plasmique. La membrane contrôle les flux entrant et sortant de la bactérie et sert de support à certaines enzymes. Ce volume est continu et ne contient en général pas de structure secondaire complexe. Toutes les réactions chimiques sources d'énergie, ou permettant l'entretien et la multiplication de la bactérie, ont lieu dans le cytoplasme. Elles peuvent néanmoins être localisées, sur la membrane par exemple. Les bactéries n'ont pas de noyau délimité par une membrane pour isoler le matériel génétique. L'information génétique est supportée par l'acide désoxyribonucléique (ADN). Cet ADN est rassemblé sous la forme d'un ou plusieurs chromosomes. La structure de ces chromosomes est une double hélice d'ADN circulaire pelotonnée sous l'effet de surenroulements. Au-delà de la membrane cytoplasmique, ou plasmique, les bactéries possèdent une paroi constituée de peptidoglycane. Elle assure la cohésion mécanique de la cellule. Certaines bactéries possèdent

uniquement une paroi épaisse et complexe. Celle-ci reste perméable au colorant de Gram et les bactéries correspondantes sont dites Gram positives. Les autres bactéries possèdent une paroi de peptidoglycanes plus simple et surtout une membrane externe. Cette dernière est imperméable au colorant de Gram, les bactéries possédant cette structure sont Gram négatives.

I.7. Antibiotiques

Les antibiotiques sont des agents antibactériens naturels, d'origine biologique, élaborés par des champignons et/ou diverses bactéries. Cependant, quelques-uns sont produits par synthèse, et beaucoup sont des dérivés hémi-synthétiques préparés par modifications chimiques de produits naturels. Certains peuvent agir sur la majorité des espèces pathogènes à Gram positif et à Gram négatif, ils sont dits « à large spectre », d'autres ont une action plus limitée (antibiotiques des bactéries à Gram positif ou des bactéries à Gram négatif), voire un spectre très étroit (antistaphylococciques, antituberculeux).

Les antibiotiques ont l'avantage, en atteignant leur cible, de détruire une structure qui est spécifiquement bactérienne, en agissant à différents niveaux de cette structure. Les antibiotiques ayant une structure chimique de base identique, qui leur confère un même mécanisme d'action antibactérienne, se classent dans une même famille, mais ils peuvent se différencier par leur spectre d'activité. Nous distinguons :

- Antibiotiques inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycane : comme les β -lactames
- Antibiotiques actifs sur les enveloppes membranaires tels que les gramicidines.
- Antibiotiques inhibiteurs des acides nucléiques : comme les rifamycines, les quinolones et les imidazoles.
- Antibiotiques inhibiteurs des synthèses protéiques : comme les tétracyclines,
- Antibiotiques inhibiteurs de la synthèse des folates : famille des sulfamidés et des 2-4-diaminopyrimidines.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressées au Métronidazole (MTZ). C'est un antibactérien synthétique dérivé de l'azomycine, un nitroimidazole produit par les genres *Actinobacteria* et *Proteobacteria*. Ce principe actif a été utilisé pour la première fois en 1960 pour traiter la *trichomonase*, une infection provoquée par le protozoaire *Trichomonas vaginalis*. De plus, le métronidazole a réussi à traiter la dysenterie et l'excès de production hépatique causés par le parasite intestinal *Entamoeba histolytica*. Il a également été efficace contre *Giardialamblia*, un autre parasite intestinal qui provoque une malabsorption et des douleurs

épigastriques et de certaines infections bactériennes anaérobies. Le principal organe responsable du métabolisme du métronidazole est le foie, où il est hydroxylé, acétylé et/ou conjugué aux glucuronides. Enfin, la majorité des déchets métaboliques sont excrétés par les reins (**A. Hernández Ceruelos et al, 2019**).

Il est important de mentionner le système de classification biopharmaceutique (SCB) tout en discutant de la solubilité et de la perméabilité des médicaments. La SCB divise les médicaments en quatre classes en fonction de leur solubilité et de leurs propriétés de perméabilité, y compris la classe I (haute solubilité et perméabilité), la classe II (faible solubilité et perméabilité élevée), la classe III (haute solubilité et faible perméabilité) et la classe IV (faible solubilité et perméabilité), qui établit un lien entre les propriétés physicochimiques des médicaments et la biodisponibilité orale. Une faible solubilité ou (et) perméabilité empêche l'absorption et la biodisponibilité de ces médicaments de classe II, III et IV (**Z. Wang et al, 2022**).

Comme il est à la fois extrêmement soluble et perméable, le métronidazole est de classe I du SCB (**C. Rediguieri et al, 2011**).

I.8. Mécanisme d'action du métronidazole

Le métronidazole diffuse dans l'organisme, inhibe la synthèse des protéines en interagissant avec l'ADN, et provoque une perte de la structure hélicoïdale de l'ADN et la rupture des brins. Par conséquent, il provoque la mort cellulaire dans les organismes sensibles.

Le mécanisme d'action du métronidazole passe par un processus en quatre étapes. La première étape est l'entrée dans l'organisme par diffusion à travers les membranes cellulaires de pathogènes anaérobies et aérobies. Cependant, les effets antimicrobiens sont limités aux anaérobies. La deuxième étape implique une activation réductrice par des protéines de transport intracellulaire en modifiant la structure chimique de la pyruvate-ferredoxine oxyda-canalase. La réduction du métronidazole crée un gradient de concentration dans la cellule, qui entraîne l'absorption de plus de médicaments et favorise la formation de radicaux libres qui sont cytotoxiques. La troisième étape, les interactions avec les cibles intracellulaires est réalisée par des particules cytotoxiques interagissant avec l'ADN de la cellule hôte, ce qui entraîne la rupture des brins d'ADN et la déstabilisation fatale de l'hélice de l'ADN. La quatrième étape est la décomposition des produits cytotoxiques (**N. Kaakoush et al, 2009**).

I.9. Activité antibactérienne des cocristaux

Bien qu'il existe peu de publications sur l'activité antimicrobienne impliquant des cocristaux, une étude approfondie sur l'utilisation de la cocrystallisation s'avère nécessaire pour remédier à la résistance bactérienne, par le biais d'une modification des caractéristiques du principe actif (**M.Bashimam, H.El-Zein, 2022**).

Les modes de résistance des bactéries aux antibiotiques sont au nombre de quatre :

- L'inactivation enzymatique par la sécrétion d'une enzyme.
- L'efflux actif.
- La modification de la cible.
- La diminution de la perméabilité (porines) à l'antibiotique.

I.10 Travaux antérieurs

Une synthèse bibliographique nous a permis de résumer les peu de travaux antérieurs effectués sur la cocrystallisation du métronidazole, en vue d'augmenter son effet antibactérien envers différents micro-organismes.

J. P. F. Whelan et al ont testé l'activité antibactérienne du MTZ contre les souches de *Bacteroides fragilis* isolées de lésions humaines par la méthode de dilution sur la gélose sanguine. Le métronidazole s'est révélé actif contre les souches de *Bacteroides fragilis* isolées de lésions humaines. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) sont équivalentes, elles sont de l'ordre de 0-16 à 2-5 µg/ml (**J. Whelan et al, 1973**).

Hachem C.Y et al ont déterminé la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'ampicilline, de la clarithromycine et du métronidazole, contre 122 isolats cliniques de *Helicobacter pylori*, par microdilution et diffusion sur disque (E-test). Une corrélation totale des résultats des deux méthodes a été obtenue en présence de l'ampicilline et de la clarithromycine. Cependant, les tests aux métronidazole ont montré des différences des CMI obtenues par les deux méthodes utilisées, avec des valeurs de 8 et 32 µg/ml, obtenues respectivement par la microdilution et la diffusion (**C. Hachem et al, 1996**).

Une étude réalisée par J.Li, et al, a porté sur la possibilité d'améliorer la biodisponibilité du MTZ en utilisant un nouveau cocrystal, par sa combinaison avec du gallate éthylique comme coformeur. Les résultats obtenus ont montré que le cocrystal synthétisé, présente une solubilité plus élevée que le PA pur, ce qui conduit à une dissolution plus rapide et une biodisponibilité plus élevée. En outre, le cocrystal MTZ-EG est physiquement stable dans l'eau pendant au moins 24 H. Sa solubilité améliorée et sa stabilité à l'état solide pendant sa dissolution, lui

confèrent les caractéristiques d'un candidat approprié pour un développement ultérieur dans une forme posologique solide orale, avec une performance biopharmaceutique améliorée (**J. Li et al, 2021**).

K. Zheng et al (2019) ont élaboré, caractérisé et évalué in vitro et in vivo la cristallisation de l'acide gallique-métronidazole selon le protocole expérimental suivant :

À une solution aqueuse agitée (20 mL) contenant du MTZ (0,8558 g, 5mmol) à 70 °C, une solution aqueuse (10 mL) de GA-H₂O (0,9407 g, 5 mmol) a été ajoutée goutte à goutte. La couleur de la solution est passée de l'incolore au jaune par l'ajout de GA-H₂O. Après agitation de la réaction pendant 1 H, la solution résultante a été filtrée et séchée sous vide.

Les résultats obtenus ont montré l'effet de la cocrystallisation dans l'amélioration des caractéristiques pharmacocinétiques des médicaments. L'étude expérimentale de synthèse a été combinée à une modélisation de la structure et des propriétés des médicaments, afin de fournir une nouvelle approche méthodologique pour le développement de nouveaux cocristaux médicamenteux, ce qui contribue au développement de nouvelles formes solides et formulations avec des performances améliorées (**K. Zheng et al, 2019**).

K. Zheng et al (2020) ont synthétisé un nouveau cocrystal de médicament antimicrobien MTZ en présence d'un composé naturel qui est, PYR. Le cocrystal formé a été caractérisé par diffraction des rayons X, analyse thermique, UV-vis et FTIR. Les résultats de dissolution in vitro ont montré que le cocrystal MTZ-PYR a un taux de dissolution plus élevé que celui du MTZ pur dans des conditions acides et neutres (**K. Zheng et al, 2020**).

Beena et al ont synthétisé des cocristaux de métronidazole/triazole et ont évalué leur activité antibactérienne. Les résultats obtenus ont montré des effets antibactériens puissants à faible concentration contre les bactéries à gram positif et négatif en comparaison avec un antibactérien de référence (**Beena et al, 2009**).

Partie expérimentale

L'objectif de ce travail est de synthétiser et de caractériser de nouvelles molécules antibactériennes, élaborées à partir de principes actifs de médicaments et de molécules organiques, jouant le rôle de coformeurs et de tester leur capacité de lutter contre des souches bactériennes, en particulier les souches résistantes aux antibiotiques habituels. Le principe actif utilisé dans ce travail est le métronidazole. Ce dernier a été mélangé avec plusieurs coformeurs choisis pour leur structure chimique, comportant plusieurs hétéroatomes, capables d'établir des interactions avec les groupements fonctionnels donneurs et accepteurs de proton du métronidazole. Un diagramme récapitulatif de la procédure expérimentale suivie est porté ci-dessous :

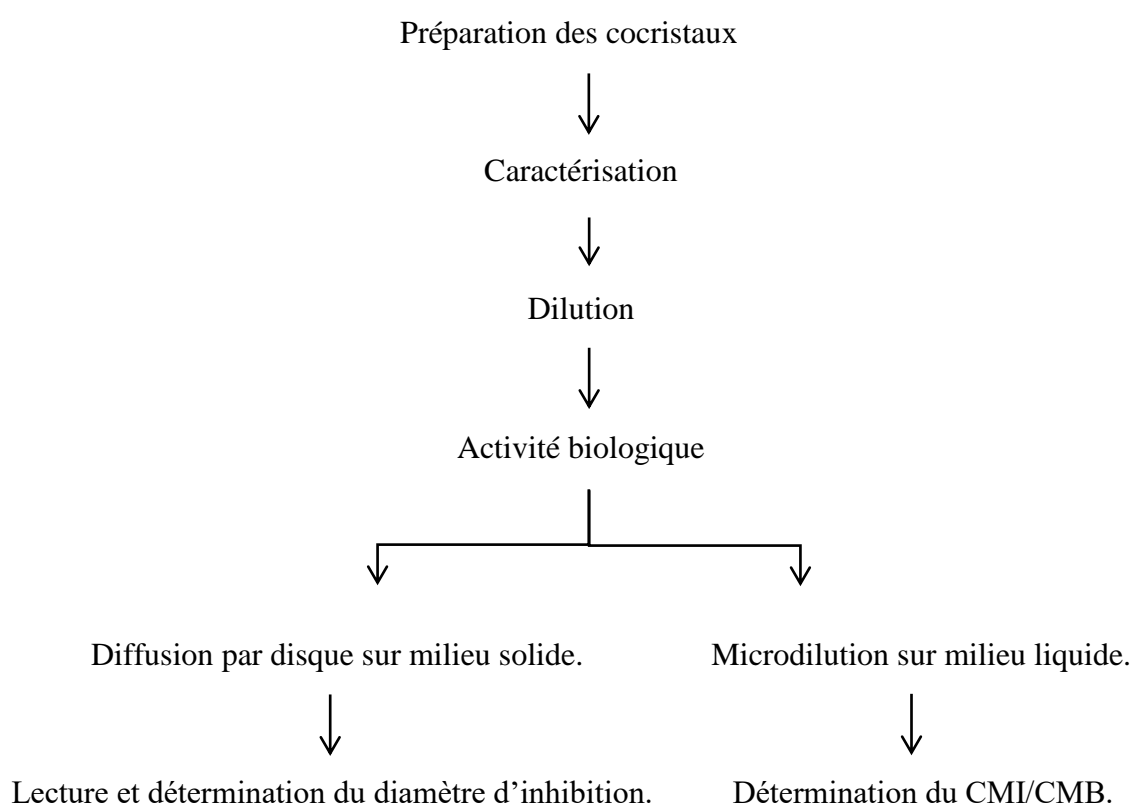


Schéma 2. Diagramme récapitulatif de la procédure expérimentale suivie.

II.1. Matériels et méthodes

II. 1.1. Produits chimiques utilisés

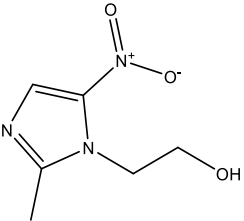
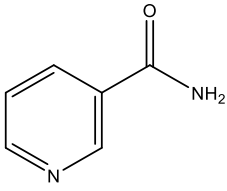
Les produits chimiques utilisés, dont la récapitulation est portée sur le (**Tableau 3**), n'ont pas subi de purification ultérieure.

Tableau 3. Produits chimiques utilisées et leurs propriétés.

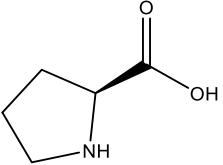
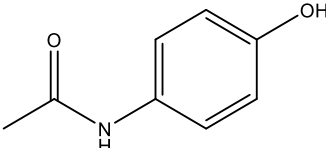
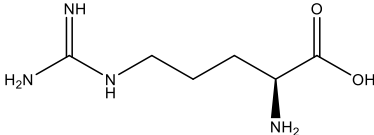
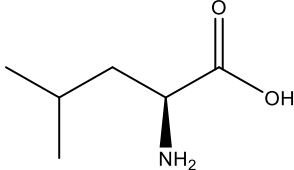
	Formule brute	Poids moléculaire (g/mol)	Pureté(%)	Source
Métronidazole	C ₆ H ₉ O ₃ N ₃	171.16	99	Alfa Aesar
Paracétamol	C ₈ H ₉ NO ₂	151.16	98	Alfa Aesar
Nicotinamide	C ₆ H ₆ NO ₂	122,12	99	Biochempharma
L-Leucine	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131.17	98	Sigma-Aldrich
L-Proline	C ₅ H ₉ NO ₂	115.13	98	Sigma-Aldrich
L-Arginine	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	174.20	98	Sigma-Aldrich

Les propriétés physico-chimiques des produits utilisés dans ce travail sont portées sur le (**Tableau 4**).

Tableau 4. Propriétés physico-chimiques des produits chimiques utilisés.

Structure	Nombre de donneurs de liaisons hydrogène	Nombre d'accepteurs de liaison hydrogène	pKa	Solubilité	Etat physique	Point de fusion
 <p>Metronidazole</p>	1	4	2.38	Très soluble dans l'eau, soluble dans l'éthanol, dans l'éther, chloroforme ; soluble dans les acides dilués ; peu soluble dans le diméthylformamide	Poudre cristalline blanc à jaune pale	160 °C
 <p>Nicotinamide</p>	1	2	3.35	Très soluble dans l'eau ; 1 g soluble dans 1 mL d'eau Soluble dans butanol, chloroforme	Poudre blanche	128 °C

Partie expérimentale

 <p style="text-align: center;">Proline</p>	2	3	1.99/10.60	<p>Très soluble dans l'eau</p> <p>Soluble dans l'éthanol, l'acétone, le benzène, insoluble dans l'éther, le propanol</p>	Poudre sèche et blanche	221 °C
 <p style="text-align: center;">Paracetamol</p>	2	2	9.38	<p>Soluble dans l'eau bouillante</p> <p>Soluble dans l'alcool, méthanol l'éthanol, l'acétone, l'acétate d'éthyle, l'éther, Insoluble dans l'éther de pétrole, le pentane, le benzène</p>	Poudre blanche	169 °C
 <p style="text-align: center;">Arginine</p>	4	4	2.24	<p>Soluble dans l'eau</p> <p>Insoluble dans ethylether</p>	Poudre blanche	223 - 224 °C
 <p style="text-align: center;">Leucine</p>	2	3	2.35	<p>Soluble dans l'eau</p> <p>Soluble dans acide Acétique l'éthanol</p>	Poudre blanche	286

II.1.2. Microorganismes testés

Les microorganismes choisis pour cette étude, récapitulés dans le (**tableau 5**) sont des souches de référence.

Tableau 5. Généralités sur les souches bactériennes utilisées (**Original, 2023**).

Souches bactériennes testé	Caractère Bactériologique	Habitats	Pouvoir pathogène	Référence
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram + Facultative anaérobique	L'Homme en est le principal réservoir contaminent, également les surfaces, l'air et l'eau. (M.Bouskraoui et al, 2017).	Infections suppuratives superficielles ou profondes : peau, tissu mou, muscle, os. Toxi infection : dues à la synthèse de différentes toxines par certaines souches. (M.Bouskraoui et al, 2017).	ATCC 25923
<i>Echerichia coli</i>	Gram – Facultative anaérobique	Hôte normal du tube digestif. (M.Bouskraoui et al, 2017).	Infections entéro-coliques, infections urinaires, toxi-infections alimentaires, infections intra-abdominales, infections néonatales (méningites). (M.Bouskraoui et al, 2017).	ATCC 25922
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gram – Anaérobique	Bactérie ubiquiste, origine d'infections nosocomiales d'origine exogène et d'origine endogène. (M.Bouskraoui et al, 2017).	Infections communautaires : oculaires, ORL, cutanées. Infections associées aux soins : pneumopathies, infections urinaires, infections post-opératoires. (M.Bouskraoui et al, 2017).	ATCC 27853
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Gram – Facultative anaérobique	Les cavités naturelles en particulier le tube digestif et les voies aérienne supérieures. (M.Bouskraoui et al, 2017).	Infections nosocomiales et communautaires : broncho-pulmonaires et urinaires. Méningites purulentes et sepsis... (M.Bouskraoui et al, 2017).	ATCC 70603

II.2. Méthode expérimentale

II.2.1. Synthèse des cocristaux par voie mécanique

II.2.1.1. Broyage assisté par liquide (LAG)

Le broyage assisté par liquide consiste en l'ajout au mélange PA/coformeur un petit volume de solvant afin de permettre une éventuelle formation d'un cocrystal. Le solvant dont il s'agit, agit en qualité de catalyseur, permettant l'établissement des interactions nécessaires pour la cocrystallisation (A. Thayyil *et al* 2020).

Afin de préparer les différents cocristaux utilisés dans ce travail, nous avons procédé comme suit :

A l'aide d'une balance analytique de type Ohaus d'une précision de 10^{-4} g, des masses du métronidazole et des différents coformeurs ont été pesées dans un rapport stœchiométrique 1 :1 (**tableau 6**). Les masses m_1 et m_2 pesées sont mélangées et broyées par un broyage humide à l'aide d'un pilon et d'un mortier pendant 30 min, assisté par ajout d'un volume de 1ml de méthanol. Une fois synthétisés, ces derniers sont placés dans une étuve pour permettre l'évaporation du solvant.

Tableau 6. Masses m_1 et m_2 du métronidazole et des différents coformeurs.

Cocristaux	Cocrystal 1 (MTZ / Paracétamol)	Cocrystal 2 (MTZ / Nicotinamide)	Cocrystal 3 (MTZ / L. Leucine)	Cocrystal 4 (MTZ / L. Proline)	Cocrystal 5 (MTZ / L. Arginine)
m_1/n_1 (mg/mmol)	52.5 / 0.3	52.5 / 0.3	173.7 / 0.8	137.3 / 0.8	136.6 / 0.8
m_2/n_2 (mg/mmol)	45.8 / 0.3	37.7 / 0.3	105.6 / 0.3	92.4 / 0.8	141.8 / 0.8

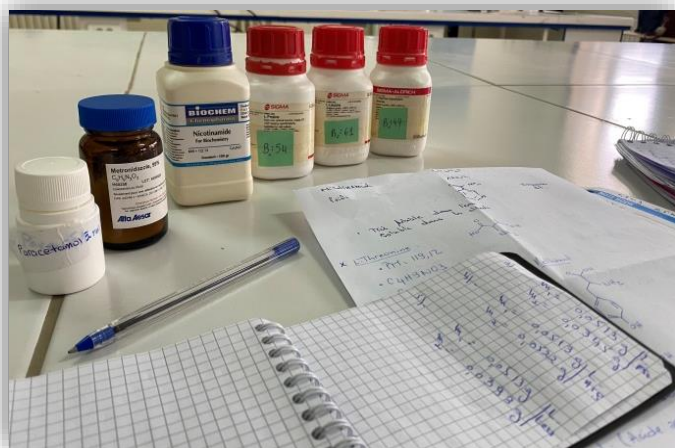


Figure 1. Calcul des concentrations (Original, 2023).



Figure 2. Broyage assisté par liquide LAG (Original, 2023).

II.3. Caractérisation des cocristaux

La cristanilité joue un rôle important dans la stabilité et la performance clinique des cocristaux pharmaceutiques, la caractérisation de cocrystal cible dans les solides est généralement déterminée par différentes techniques, comme la DSC, la DRX, le MEB et le FTIR. Les instruments de caractérisation employés proviennent du laboratoire CRAPS.

II.3.1 Calorimétrie différentielle à balayage DSC

La calorimétrie différentielle à balayage (DSC en anglais abréviation de Differential Scanning Calorimetry) est une technique d'analyse thermique utilisée pour la caractérisation de changement d'état, de phase ou de structure d'un matériau. Elle permet de mesurer un flux de chaleur échangée par un échantillon et le four par rapport à une référence inerte en fonction de la température et le temps, quand ils sont soumis à un même programme de chauffage ou de refroidissement (où T varie linéairement avec t).

La différence de Température est convertie en une différence de flux de chaleur en mW. Par cette technique, on pourra donc, identifier les événements thermiques que peuvent subir un composé. Ces événements peuvent être réversibles, telles qu'une fusion ou une recristallisation, ou irréversibles, telles qu'une dégradation ou une réaction chimique par chauffage.

Pour réaliser l'analyse calorimétrique différentielle (DSC), nous avons utilisé un appareil DSC Setaram 131 (**figure 3**) avec des creusets en aluminium de 30 μ l de volume et des thermocouples en Platine. La prise d'essai est d'environ 1 à 2 mg. L'analyse a été faite sous atmosphère d'azote avec une vitesse de chauffage de 2°C/min, depuis la température ambiante (20°C)

jusqu'à 250°C. L'étalonnage des températures a été faite par l'indium, dont la température de fusion est de 156.6°C et dont l'enthalpie de fusion est 28.5 J/g.

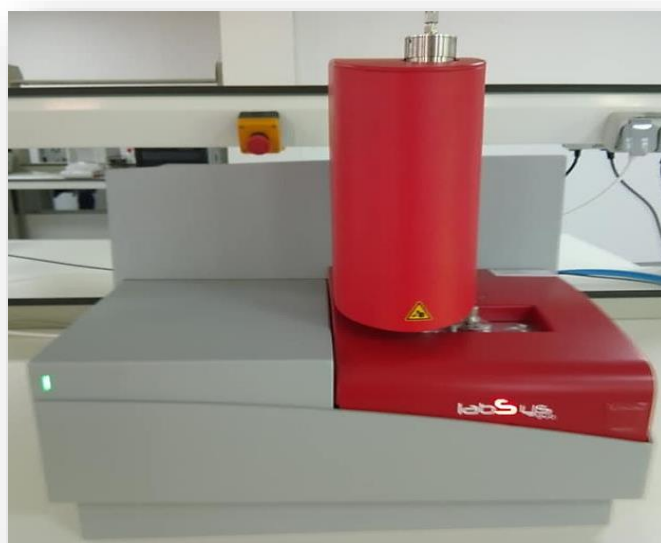


Figure 3. DSC utilisé pour la mesure des flux de chaleur (Original, 2023).

II.3.2. Diffraction des rayons DRX

La diffraction des rayons X est l'une des méthodes d'analyses physicochimiques exploitées dans la caractérisation des réseaux cristallins. Les rayons X, comme toutes les ondes électromagnétiques, provoquent un déplacement du nuage électronique par rapport au noyau dans les atomes ; ces oscillations induites provoquent une réémission d'ondes électromagnétiques de même fréquence. Selon la direction de l'espace, un flux important ou faible de photons X ait lieu, ces variations selon les directions forment le phénomène de diffraction X. En utilisant la loi de Bragg, on pourra déterminer la distance réticulaire

Pour l'analyse par diffraction des rayons X, nous avons utilisé un diffractomètre de type EMPYREAN (**figure 4**). L'émission des rayons X est effectuée grâce à une radiation $\text{Cu}(K\alpha)$ à température ambiante pour une gamme de 2 θ comprise entre 2 et 50°, avec un pas de 0,01° et une vitesse de balayage de 2° / min.



Figure 4. Diffractomètre de type EMPYREAN (Original, 2023).

II.3.3. Microscopie électronique à balayage MEB

La microscopie électronique à balayage est une technique permettant de visualiser le comportement dispersif du matériau. Son principe consiste à explorer la surface de l'échantillon par un faisceau d'électrons très fin qui balaie point par point la surface de ce dernier. Sous l'impact de ce faisceau d'électrons accélérés, des électrons rétrodiffusés et des électrons secondaires émis par l'échantillon sont recueillis sélectivement par des détecteurs qui transmettent un signal à un écran cathodique dont le balayage est exactement synchronisé avec le balayage de l'objet. Cette technique nous permet d'avoir des renseignements sur la topographie, la morphologie et la composition de l'échantillon. L'appareillage utilisé est le microscope électronique à balayage environnemental de type Thermo Fischer SCIO2S. L'analyse par microscopie électronique à balayage permet de voir la forme des particules obtenues à l'échelle microscopique ainsi que leur taille.

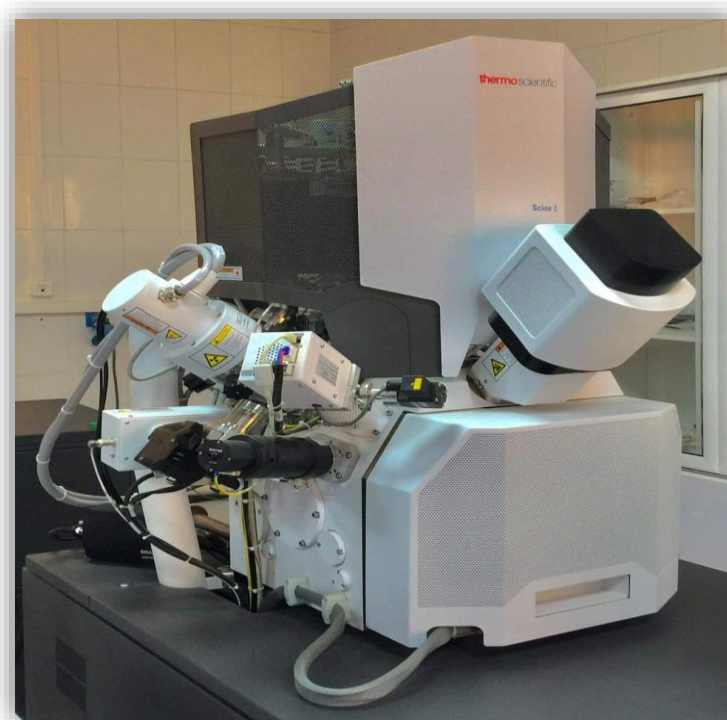


Figure 5. Microscope électronique à balayage environnemental de type Thermo Fischer SCIO2S (Original, 2023).

II.3.4. Infra-rouge a transformé de fourrier FTIR

La spectroscopie infrarouge est principalement, utilisée pour étudier les interactions entre les molécules, en analysant le profil du mode vibratoire, à savoir : la position, la largeur et l'intensité des bandes spectrales. La position du pic ou de la bande indique non seulement la présence d'un groupe particulier, mais donne également une bonne idée de l'environnement qui l'affecte. Il est bien connu que les forces intermoléculaires dues aux interactions par liaison hydrogène, entraînent un changement remarquable de certains des modes de vibration, permettant ainsi l'étude des interactions.

La formation de la liaison hydrogène est d'une importance capitale dans de nombreux procédés industriels, elle joue un rôle central dans les processus biologiques au niveau moléculaire.

Elle est responsable de la réorganisation structurale des molécules de mélanges, elle détermine également la structure et les propriétés de beaucoup de molécules et macromolécules biologiques.

La spectroscopie infrarouge joue un rôle crucial dans l'étude de la liaison hydrogène.

Afin de confirmer la cocrystallisation de notre principe actif, nous avons procédé à une analyse par Infra-rouge en utilisant un spectrophotomètre de type Jasco FT/IR-4200, représenté sur la (figure 6).



Figure 6. Spectrophotomètre Jasco FT/IR-4200 (Original, 2023).

II.4. Détermination de l'activité antibactérienne des cocristaux élaborés

II.4.1. Dissolution du principe actif pur et de ses cocristaux par le DMSO

A l'aide d'une balance analytique de type Ohaus, nous avons pesé des masses bien déterminées du principe actif pur et du cocrystal (**tableau 7**). Les cocristaux ont ensuite été dissous dans 5 ml du DMSO (Dimethylsulfoxyde) et homogénéisés au moyen d'un agitateur Vortex (**figure 7**).

Tableau 7. Masses du principe actif pur et des cocristaux.

Matière pesé	Masse en (mg)
Métronidazole pur	61
Cocrystal 1	60
Cocrystal 2	61.4
Cocrystal 3	61.8
Cocrystal 4	61.4
Cocrystal 5	60.7



Figure 7. Dissolution des cocristaux dans du DMSO (Original, 2023).

II.4.2 Préparation des cocristaux dilués à 1/2, 1/5 et 1/10

Afin d'obtenir une gamme de concentration, nous avons dilué la solution mère en trois concentrations filles, à savoir, les concentrations de 1/2, 1/5, 1/10 respectivement. De plus, le contrôle positif est également dilué. Le même volume (50µl) de DMSO (Dimethylsulfoxyde) est utilisé comme témoin négatif.

Les volumes que nous avons utilisés sont comme suit :

1\2 : 25 µl cocrystal brut + 25 µl DMSO.

1\5 : 10 µl cocrystal brut + 40 µl DMSO.

1\10 : 5 µl cocrystal brut + 45 µl DMSO.

50 µl cocrystal brut.

II.5. Etude de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne a été évaluée en utilisant deux méthodes :

- La méthode de diffusion sur milieu solide qui consiste en l'observation de la zone d'inhibition de la croissance bactérienne.

- La méthode de dilution en milieu liquide, qui se base sur la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et les concentrations minimales bactéricides (CMB) des cocristaux.

II.5.1. Méthode de diffusion sur disque

II.5.1.1. Préparation de la préculture

Il est nécessaire d'effectuer les tests antimicrobiens à partir de cultures bactériennes jeunes âgées de 18 à 24 heures et en phase de croissance exponentielle. La régénération des souches est réalisée en introduisant l'espèce bactérienne dans un milieu de culture (MH).



Figure 8. Repiquage des souches bactériennes (Original, 2023).

II.5.1.2. Préparation de la suspension bactérienne

Après avoir cultivé les bactéries dans le milieu gélosé MH, nous avons sélectionné 3 à 5 colonies bien isolées et identiques. Ces dernières ont été transférées dans 5 ml d'eau physiologique stérile et agitées par un agitateur vortex. La suspension bactérienne est standardisée à une concentration de 10^6 UFC, correspondant à une absorbance de 0,08-0,1 mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre UV à une longueur d'onde de 625 nm.

II.5.1.3. L'ensemencement

Préparer le MH conformément aux instructions du fabricant et le laisser refroidir jusqu'à ce qu'il atteigne une température proche de la température ambiante.

Répartition de la suspension bactérienne : À l'aide d'un écouvillon stérile, répartir la suspension bactérienne sur toute la surface du MH. Il est important de veiller à ce que la distribution soit homogène.

Incubation : Incuber les boîtes de pétri à 37 °C pendant 24 heures pour permettre la croissance bactérienne.

II.5.1.4. Préparation des disques

Une fois l'ensemencement des bactéries dans le milieu de culture MH est établi, des disques en papier Wattman N°3 sont placés sur la surface de la gélose, en utilisant une pince stérilisée, puis ils sont imbibés avec 10 µl de cocristaux brut et dilués. Trois disques imbibés de chaque concentration sont placés dans la même boîte de pétri.

Les boîtes de pétri contenant toutes les concentrations des différents cocristaux synthétisés, sont incubés à la température de 37°C pendant 24 heures. Une fois l'incubation est achevée, les diamètres d'inhibition des différentes bactéries testées sont mesurés en utilisant un pied à coulisse.

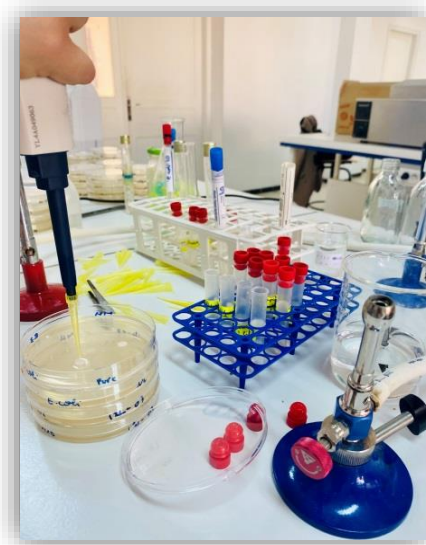


Figure 9. Préparation des disques imbibés des cocristaux (Original, 2023).

II.5.2. Méthode de micro dilution en milieu liquide

La méthode de microdilution a été utilisée pour déterminer l'efficacité antibactérienne des cocristaux de métronidazole dans un milieu liquide. Elle permet l'évaluation des concentrations bactéricides minimales (CMB) et des concentrations inhibitrices minimales (CMI) pour les cocristaux utilisés dans ce travail.

II.5.2.1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La CMI est la plus faible concentration d'antibiotique qui inhibe la croissance visible après une période d'incubation de 18 à 24 heures. Elle permet de définir la sensibilité ou la résistance des souches bactériennes aux antimicrobiens (Kalban et al, 2008).

II.5.2.2. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)

La concentration bactéricide minimale (CMB) est la concentration d'un agent antimicrobien qui laisse au plus 0,01de germes survivants (Moroh et al, 2008). C'est la plus faible concentration nécessaire pour tuer les bactéries présentes dans une culture.

II.5.2.3. Préparation des microplaques

La CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) des microorganismes étudiés a été évaluée au moyen d'une microplaque stérile à 96 puits, en utilisant une seule plaque pour chaque Cocrystal. Pour ce faire, nous avons procédé comme suit (figure 10) :

Les puits sont inoculés avec 100 µl de bouillon Mueller Hinton liquide à l'exception des rangées (B D, F et H) restant vides pour éviter une éventuelle contamination. Aux puits 1 à 6, 100 µl des différents cocristaux synthétisés ont été ajoutés. Les puits 7 à 12 ont été conservés pour le contrôle positif par le biais du principe actif pur, à savoir le métronidazole. Une dilution de l'ordre de 1/2 en série a été effectuée sur les différents puits remplis. Un volume de 100 µl des quatre bactéries testées dans ce travail, *E.coli*, *P.aeruginosa*, *S.aureus* et *K.pneumoniae* ont été ajouté dans les puits en question. Le volume final : Bouillon, cocrystal et bactérie est de 200 µl. Une fois la microplaque est préparée, une incubation de 18 heures à 37°C est indispensable pour la lecture des résultats escomptés.

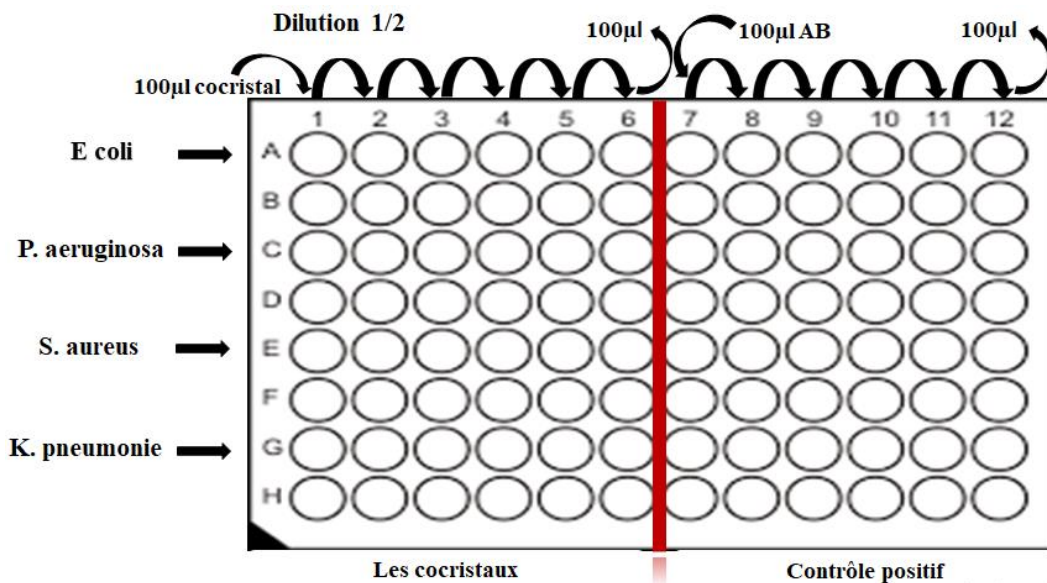


Figure 10. Préparation des microplaques (Original, 2023).

II.5.2.4. Révélation de l'activité antibactérienne par le chlorure d'Iodonitrotétrazolium (INT)

Une fois l'incubation est achevée, une solution à 0,2 mg/ml de chlorure d'Iodonitrotétrazolium (INT) a été ajoutée au contenu des 48 puits. Ce dernier joue le rôle d'un oxydant, il agit par conséquent, comme un accepteur d'électrons, il subit une réduction par des bactéries viables pour produire un produit coloré. Ce réactif de couleur jaune se colore en rose violet après réduction par les bactéries. Une deuxième incubation pendant 30mn s'avère nécessaire pour évaluer la CMI.

Après incubation, les échantillons des puits non colorés ont étéensemencés et incubés pendant 18 heures à 37°C pour déterminer la CMB.

Résultats et discussion

Dans ce chapitre, une discussion générale des résultats obtenus sera entreprise. Cette dernière concerne la synthèse, la caractérisation et l'évaluation de l'activité antibactérienne des cinq cocristaux élaborés en se basant sur des interactions non-covalentes entre le métronidazole et les cinq coformeurs sélectionnés.

III.1. Cocristaux synthétisés

Les cocristaux préparés par broyage humide du métronidazole avec les différents coformeurs choisis selon leur structure chimique et leur non toxicité, à savoir : la L-proline, L-arginine, L-leucine, le nicotinamide et le paracétamol, ont subi un changement de couleur (**figure 13**) du blanc au jaune, blanc cassé et marron. Ce changement est une preuve visuelle qui suggère un changement de phase possible lors du broyage, impliquant la formation de nouveaux composés, de points de fusion différents de ceux des composés de départ. Ceci confirme l'établissement des interactions physiques entre les hétérosyntons, comme la liaison hydrogène, les forces de Van der Waals et les interactions π - π .

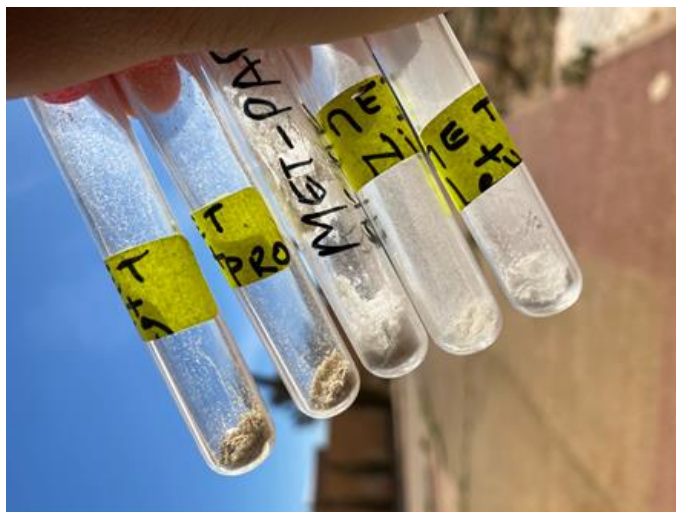


Figure 13. Etat physique et couleur des poudres des différents cocristaux synthétisés (**Original, 2023**).

III.2. Caractérisation

III.2.1. Calorimétrie différentielle à balayage (DSC)

Les thermogrammes obtenus par une analyse calorimétrique différentielle sont portés dans la (**figure 14**).

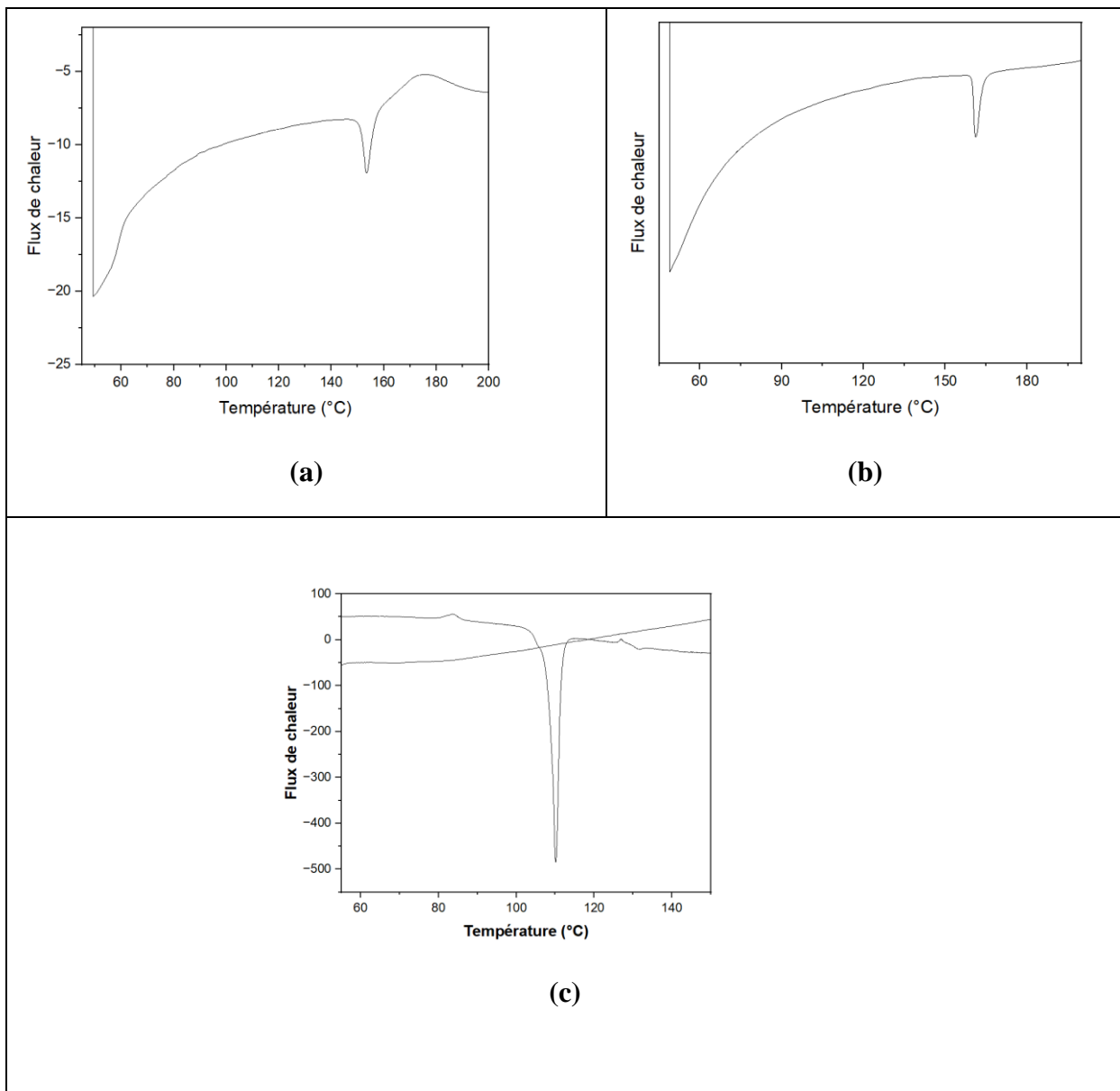


Figure 14. Thermogrammes de quelques cocristaux synthétisés: (a) cocrystal 4, (b) cocrystal 5, (c) cocrystal 2.

D'après l'allure des thermogrammes, nous pouvons constater ce qui suit :

- Mélange MTZ/Pro : formation d'un cocrystal, qui se traduit par la présence d'un seul accident thermique, de point de fusion intermédiaire entre celui des deux corps purs formant le mélange.
- Mélange MTZ/Arg : formation d'un point eutectique, qui s'explique par la présence d'un seul évènement thermique de point de fusion inférieur à celui des corps purs du départ.
- Mélange MTZ/Nic : formation d'un point eutectique de point de fusion inférieur à celui des deux corps purs.

III.2.2. Analyse par DRX

La (figure 15) représente les diffractogrammes du métronidazole et des deux mélanges binaires métronidazole/nicotinamide.

D'après la figure, nous pouvons constater que les mélanges métronidazole/nicotinamide ont fait apparaître de nouveaux pics à $2\theta = 14,38$; 18 ; $25,5$; $25,9$; 28 . Cette apparition se traduit par la formation d'une nouvelle phase cristalline.

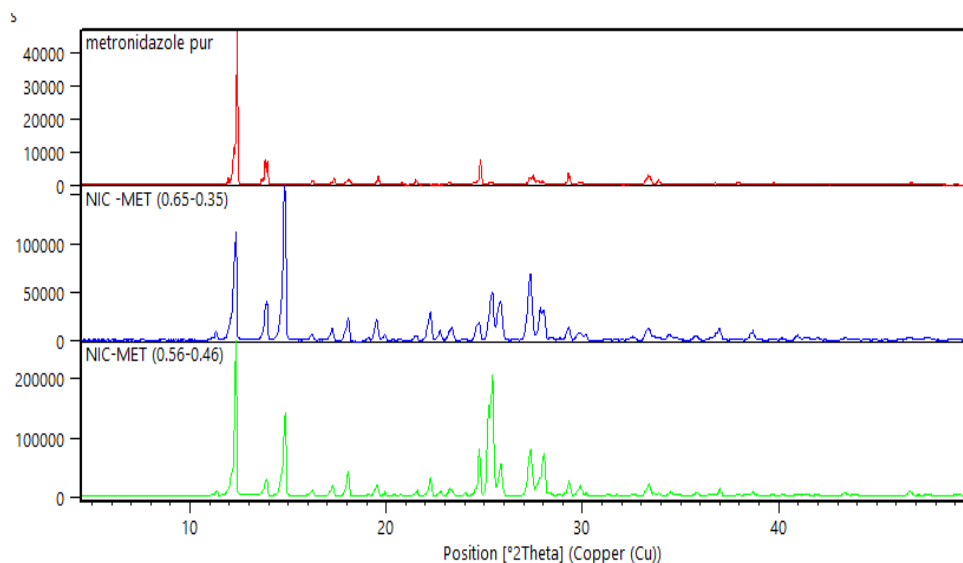
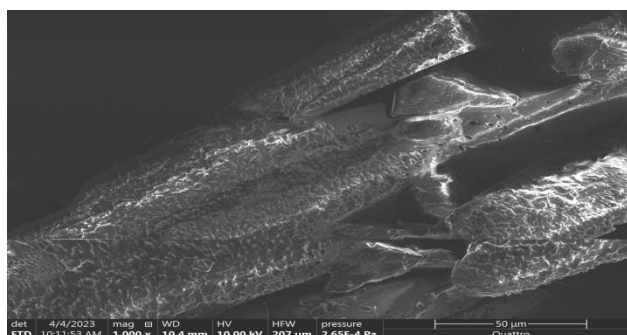


Figure 15. Diffractogrammes du métronidazole et du cocrystal 2 (MTZ/Nicotinamide).

III.2.3. Caractérisation des cocristaux synthétisés par microscopie électronique à balayage

La (figure 16) illustre quelques micrographies prises par MEB du métronidazole, L-Arginine, L-Proline, cocrystal 4 et cocrystal 5.



(a)

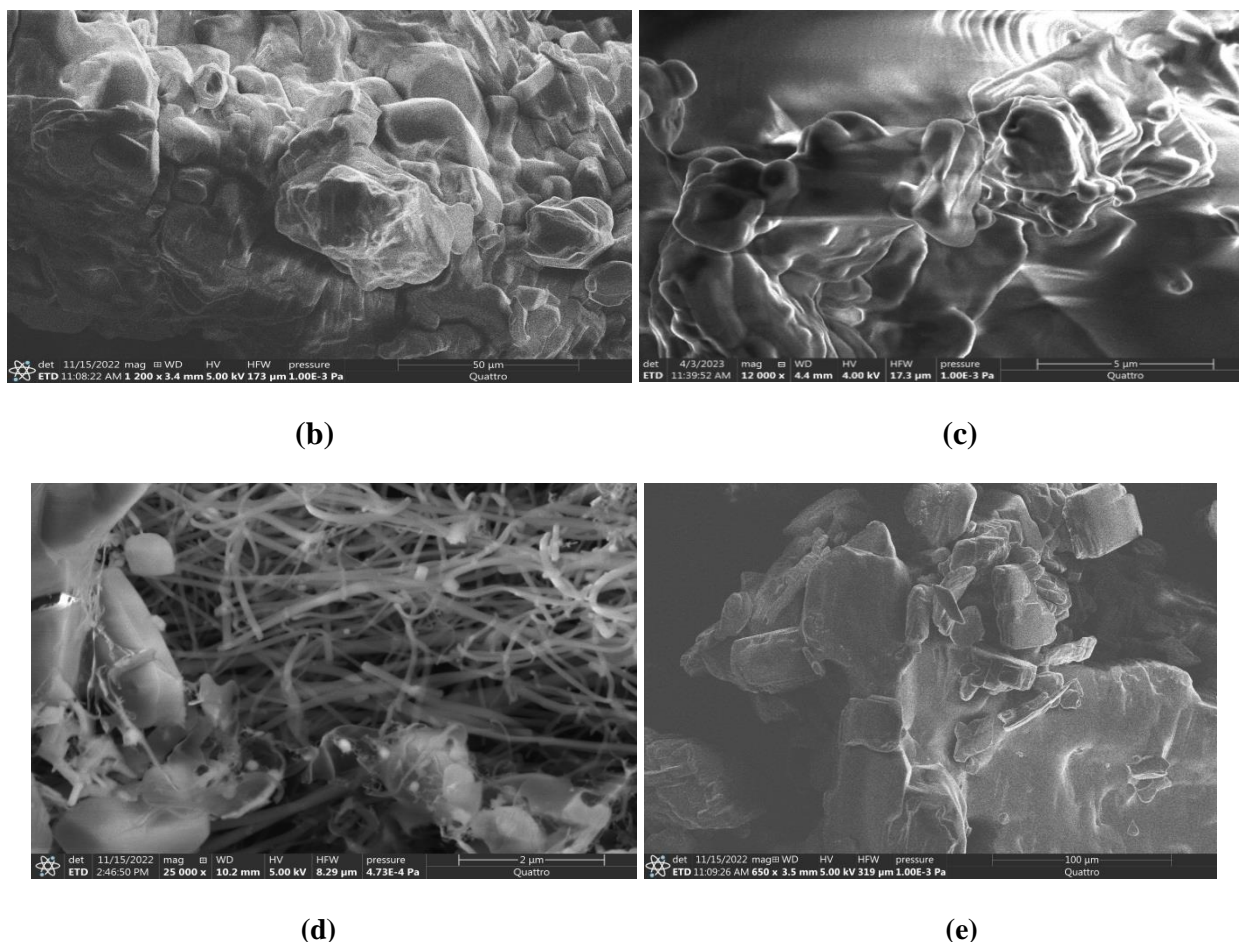


Figure 16. Morphologies de quelques cocristaux synthétisés et leurs corps purs (a) Métronidazole, (b) L-Arginine, (c) L-Proline, (d) Métronidazole + L- Arginine, (e) Métronidazole + L- Proline.

Ces micrographies montrent des cristaux de relief et de forme différents.

Des structures plaquettaires en forme rectangulaire moyennement aggloméré sont constatées dans le métronidazole pur. Le cocrystal 4, correspondant au mélange binaire équimolaire Métronidazole –L- Proline se présente sous une morphologie plaquettaires de différentes formes et de différentes dimensions. La morphologie du mélange équimolaire métronidazole-L-Arginine formant le cocrystal 5, est sous la forme de bâtonnets de différentes dimensions en une faible agglomération. Ces résultats confirment ceux obtenus par DRX, et qui montrent la formation de nouvelles structures cristallines, caractérisées par un seul accident thermique.

III.2.4. Caractérisation par FTIR

La spectroscopie infrarouge est une technique efficace permettant de qualifier les interactions intermoléculaires présentes dans les solides tels que les cocristaux et les sels. Elle permet de déterminer la nature des interactions, par le biais des différentes fréquences dues à la vibration et à l'élongation des liaisons établies par les groupements fonctionnels donneurs et accepteurs de protons.

Afin de procéder à l'analyse de quelques cocristaux élaborés par broyage humide, les échantillons ont été finement broyés et mélangés au bromure de potassium. Les spectres sont enregistrés avec une résolution de 2 cm^{-1} .

Les spectres infrarouges des cocristaux 4 et 5 et leurs corps purs sont reportés sur la (**figure 17**)

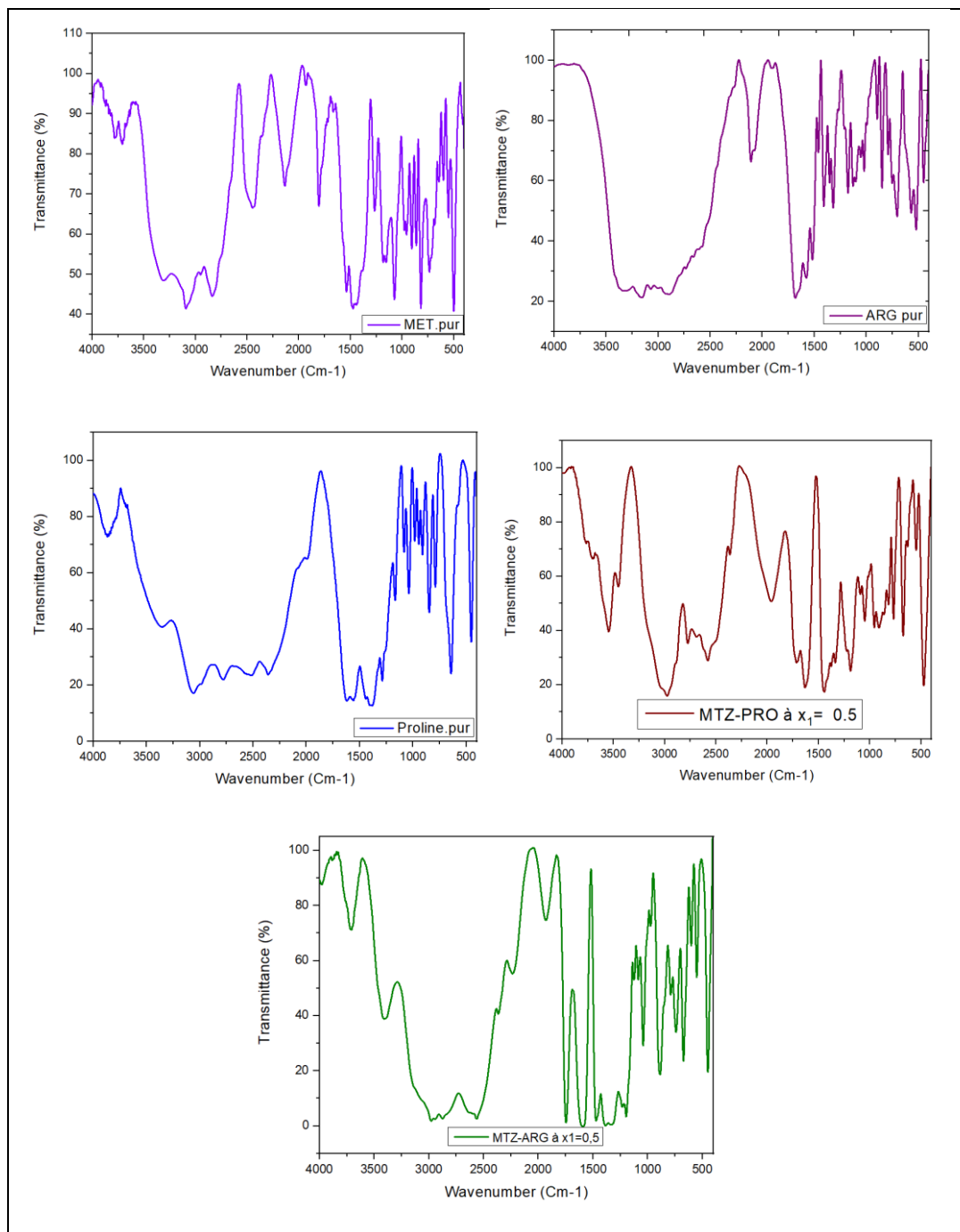


Figure 17. Spectres infrarouges du métronidazole, de l'arginine, de la proline et des mélanges binaires métronidazole/arginine et métronidazole/proline.

Les spectres représentés sur la (**figure 17**) montrent la présence d'une bande large entre 3500 à 3300 cm^{-1} , révélatrice de l'association par vibration de valence du groupe OH intermoléculaire.

Une autre bande a été localisée pour les différents spectres entre 3500 à 3100 cm^{-1} , qui indique la vibration de valence du groupe NH intermoléculaire.

III.3. Détermination de l'activité antibactérienne des cocristaux du métronidazole

III.3.1. Activité antibactérienne en milieu solide

L'activité antibactérienne du contrôle positif (métronidazole), des différentes combinaisons PA/coformeur à différentes concentrations et du DMSO en qualité de solvant de solubilisation utilisé comme contrôle négatif, a été évaluée sur quatre souches bactériennes, il s'agit de l'*Escherichia coli*, du *Pseudomonas aeruginosa*, de la *Klebsiella pneumoniae* et du *Staphylococcus aureus*.

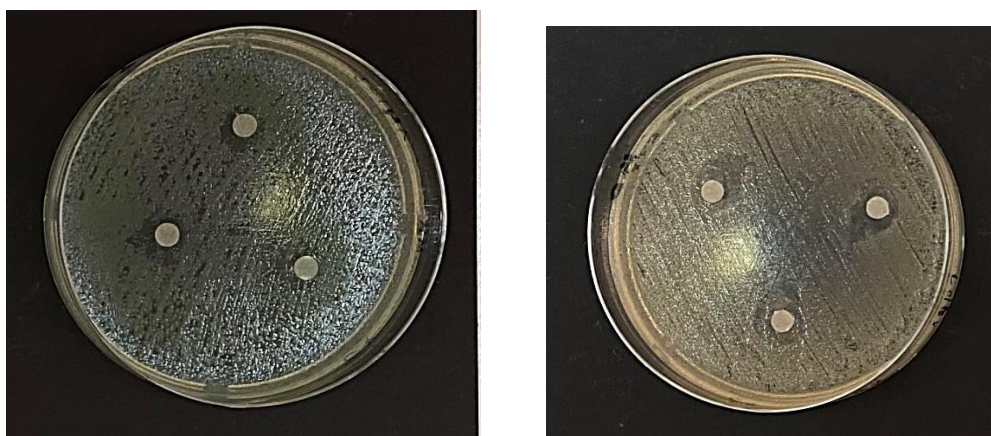
III.3.1.1. Résultats du contrôle positif

Des antibiogrammes en présence du contrôle positif, s'agissant en l'occurrence du métronidazole pur de concentration 60 mg/ml ont été effectués sur les quatre souches bactériennes. Les résultats obtenus représentés sur la (**figure 18**) révèlent tous la présence d'un halo d'inhibition de croissance bactérienne, correspondant à un diamètre d'inhibition compris entre 6.92 mm et 13.81 mm.

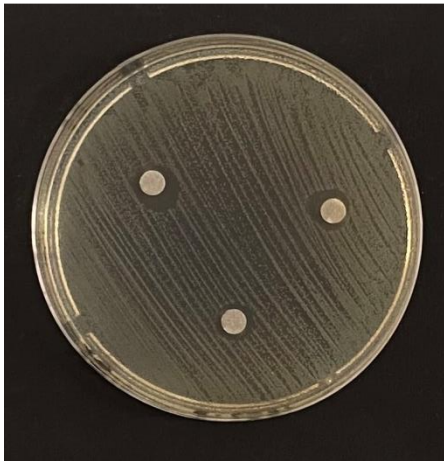
La séquence de réactivité du contrôle positif est comme suit :

Klebsiella pneumoniae > *Pseudomonas aeruginosa* > *Escherichia coli* > *Staphylococcus aureus*

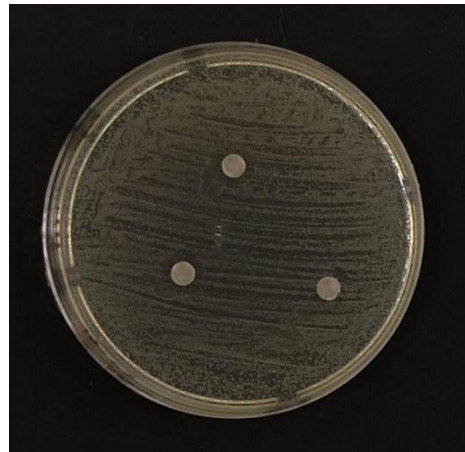
Le *Staphylococcus aureus* est le microorganisme le plus résistant au métronidazole pur en raison de la faible perméabilité de l'agent bactérien. Ces résultats sont en accord avec la littérature (N. Islam et al, 2022).



Pseudomonas aeruginosa



Klebsiella pneumoniae



Echerichia coli

Staphylococcus aureus

Figure 18. Effet du contrôle positif du MTZ pur sur les quatre souches bactériennes testées.

III.3.1.2. Résultats du contrôle négatif

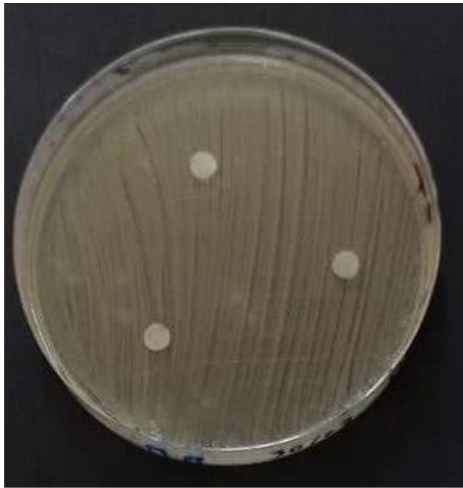
La (figure 19) montre qu'aucune inhibition de croissance n'est observée pour le contrôle négatif. Le DMSO n'exerce aucun effet sur la croissance de toutes les bactéries en milieu gélosé. Ceci confirme le bon choix du solvant utilisé pour la solubilisation.



Pseudomonas aeruginosa



Klebsiella pneumoniae



Echerichia coli



Staphylococcus aureus

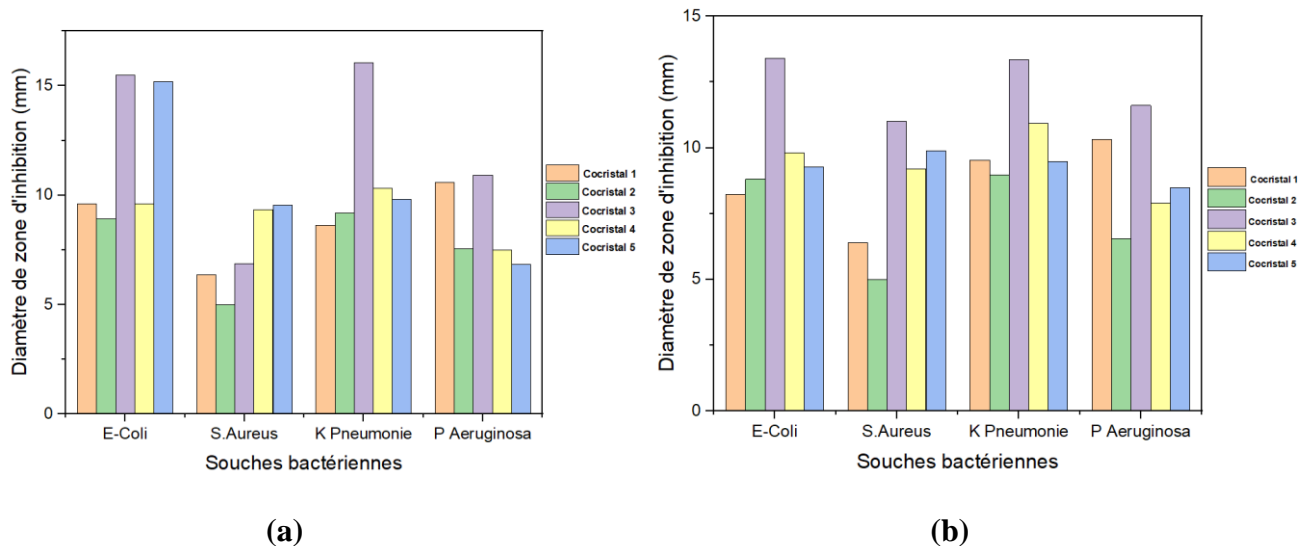
Figure 19. Effet du contrôle négatif (DMSO) sur les quatre souches bactériennes testées.

III.3.1.3. Résultats des tests de l'effet antibactérien des cinq cocristaux synthésés

Les antibiogrammes des différents cocristaux bruts et dilués étudiés formés de la combinaison physico-chimique PA/coformeur sont récapitulés dans le (tableau 8) et illustrés sur la (figure 20).

La séquence de réactivité des cinq cocristaux synthésés est comme suit :

Cocristal 3 > Cocristal 5 > Cocristal 4 > Cocristal 1 > Cocristal 2



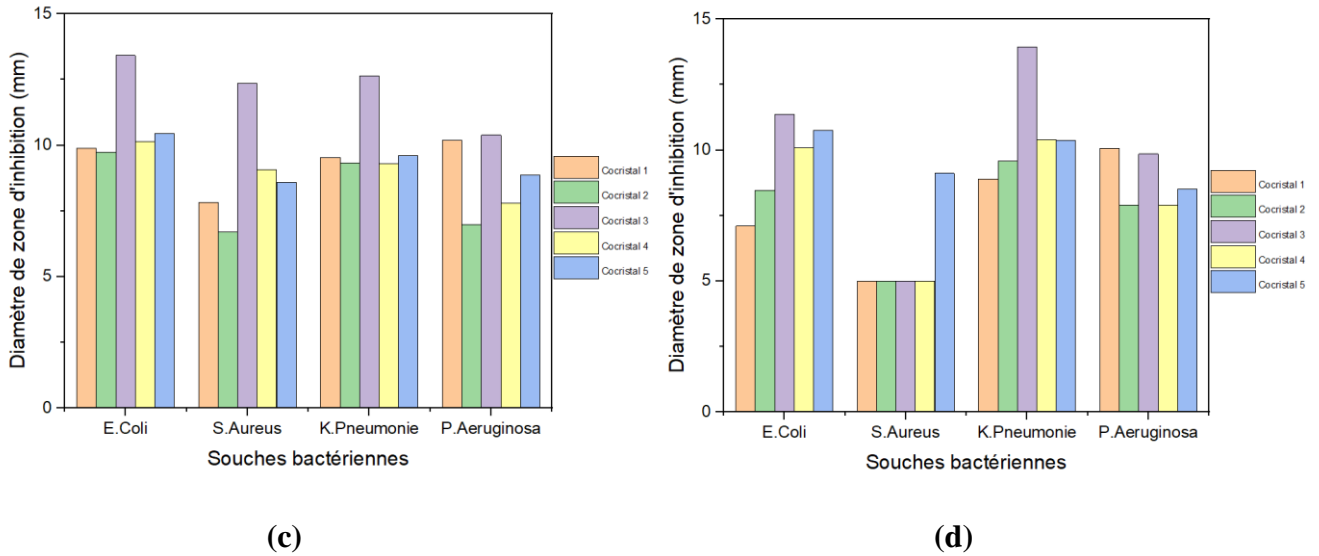


Figure 20. Histogrammes des résultats des antibiogrammes des cinq cocristaux vis-à-vis les souches bactériennes testées : **(a)** Histogramme comparatif des cinq cocristaux bruts de concentration C_0 ; **(b)** Histogramme comparatif des cinq cocristaux dilués de concentraion $C_0/2$; **(c)** Histogramme comparatif des cinq cocristaux dilués de concentraion $C_0/5$; **(d)** Histogramme comparatif des cinq cocristaux dilués de concentraion $C_0/10$.

Tableau 8. Résultats des tests de l'activité antibactérienne obtenus par diffusion en milieu solide des cinq agents antibactériens synthétisés.

Bactéries	Diamètre de zone d'inhibition en (mm)																					
	COCRISTAL 1				COCRISTAL 2				COCRISTAL 3				COCRISTAL 4				COCRISTAL 5				C+	C-
	Solution mère	1/2	1/5	1/10	Solution mère	1/2	1/5	1/10	Solution mère	1/2	1/5	1/10	Solution mère	1/2	1/5	1/10	Solution mère	1/2	1/5	1/10		
<i>E. coli</i>	9.6	8.23	9.89	7.1	8.92	8.81	9.73	8.47	15.49	13.4	13.42	11.36	9.6	9.8	10.14	10.10	15.2	9.28	10.45	10.76	8.27	5
<i>S. aureus</i>	6.36	6.39	7.83	5	5	5	6.7	5	6.88	11	12.36	5	9.35	9.2	9.06	5	9.54	9.89	8.59	5	6.92	5
<i>K. pneumonie</i>	8.63	9.54	9.54	8.89	9.2	8.96	9.32	9.58	16.05	13.34	12.64	13.93	10.33	10.92	9.30	10.40	9.8	9.48	9.61	10.36	13.81	5
<i>P. aeruginosa</i>	10.57	10.32	10.2	10.06	7.55	6.54	6.98	7.91	10.92	11.61	10.39	9.85	7.5	7.9	7.80	7.90	6.85	8.48	8.86	8.52	9.03	5

Les cinq cocristaux synthétisés manifestent des diamètres d'inhibition de 6 à 16 mm. Ces valeurs ont été obtenues par l'antibiogramme des bactéries à gram négatif. Ces halo d'inhibition peuvent être expliqués par la structure chimique de ces composés ainsi que la nature des interactions mises en jeu lors de leur formation. Ainsi, les pouvoirs antibactériens les plus élevés ont été enregistrés chez les combinaisons PA/acide aminé, s'expliquant par leur mécanisme d'action vis-à-vis de ces microorganismes. Le métronidazole et ses cocristaux agissent sur l'ADN, en se liant aux protéines nucléiques de ces microorganismes, ils inhibent les protéines de synthèse, ce qui engendre l'inhibition ou la mort du microorganisme.

L'histogramme obtenu à partir des cocristaux de concentration C_0 (**figure 20.a**) montre une activité antibactérienne élevée du cocristal obtenu par l'interaction métronidazole/L-leucine sur les bactéries à gram négatif. Il manifeste un halo d'inhibition d'un diamètre allant de 9.85 à 16.05. La séquence de réactivité de ce cocristal vis-à-vis les trois souches bactériennes à gram négatif est comme suit :

Klebsiella pneumoniae* > *Escherichia coli* > *Pseudomonas aeruginosa

Le *Staphylococcus aureus* est une souche résistante à l'antibiotique pur et ses cocristaux, cette résistance peut être due à la modification de la cible ou l'inactivation enzymatique.

L'histogramme de la (**figure 20.b**) illustre l'activité antibactérienne des cocristaux de concentration $C_0/2$. D'après cet histogramme, nous pouvons constater ce qui suit :

- Les cocristaux ayant des acides aminés comme coformeurs manifestent l'activité antibactérienne la plus élevée en présence des quatre souches bactériennes testées. Cette dernière se traduit par des diamètres de zone d'inhibition allant de 7.9 à 13.34 mm.
- La valeur la plus petite concerne l'effet antibactérien du cocristal 4 sur la souche bactérienne *P.aeruginosa*. Quant à la valeur maximale, elle correspond à l'inhibition causée par le cocristal 3 sur la *K.pneumoniae*.
- Le *Staphylococcus aureus* présente une sensibilité, correspondant à un halo d'inhibition d'un diamètre de 11 mm, obtenu en présence du cocristal 3 en qualité d'agent bactérien. Cette légère sensibilité s'explique par les complémentarités structurales et électrostatiques entre la leucine de cet agent antibactérien et les séquences d'acides aminés constituant les protéines du microorganisme.

Les effets antibactériens des cocristaux synthétisés de concentration $C_0/5$ sont représentés sur l'histogramme de la (**figure 20.c**).

Les valeurs obtenues des diamètres de zone d'inhibition des différentes activités antibactériennes des cinq agents antibactériens varient entre 6.7 et 13.42 mm.

L'*Escherichia coli* qui est une bactérie anaérobie à gram négatif est la plus sensible en comparaison avec le contrôle positif. Cet effet de synergie peut être due soit, à la présence des atomes d'azote et d'oxygène, donneurs et accepteurs de protons capables d'interagir avec la cible bactérienne ou bien l'augmentation de la perméabilité du principe actif combiné, se traduisant par une activité antibactérienne plus importante. Ces résultats sont en accord avec la littérature (**N. Islam et al, 2022**).

La valeur la plus petite de diamètre de 6.7 mm obtenue par effet du cocrystal 2 sur le *S.aureus* peut être expliquée par la structure chimique de cet agent antibactérien, qui présente un déficit en groupements donneurs et accepteurs de protons, ce qui diminue les possibilités d'interaction avec la cible bactérienne.

A la concentration de $C_0/10$, représentée sur l'histogramme de la (**figure 20.d**), nous pouvons déduire que les souches bactériennes sont sensibles à moyennement sensibles. Les valeurs obtenues oscillent entre 7.1 et 13.93.

Le *S.aureus* présente un effet antagoniste au contrôle positif, quant à sa résistance aux différents cocristaux.

En conclusion

Les cocristaux synthétisés dans ce travail agissent d'une manière semblable vis-à-vis des souches bactériennes spécifiques c'est-à-dire ils manifestent un effet de synergie envers les bactéries à gram négatif et un effet antagoniste envers le *S.aureus*, bactérie à gram positif. Les inhibitions les plus importantes se traduisant par des diamètres élevés se manifestent en présence du cocrystal 3, en qualité d'agent antibactérien (**figure 21**). Quant aux activités antibactériennes, correspondant aux quatre cocristaux restants, elles sont illustrées sur (**l'annexe 2**).

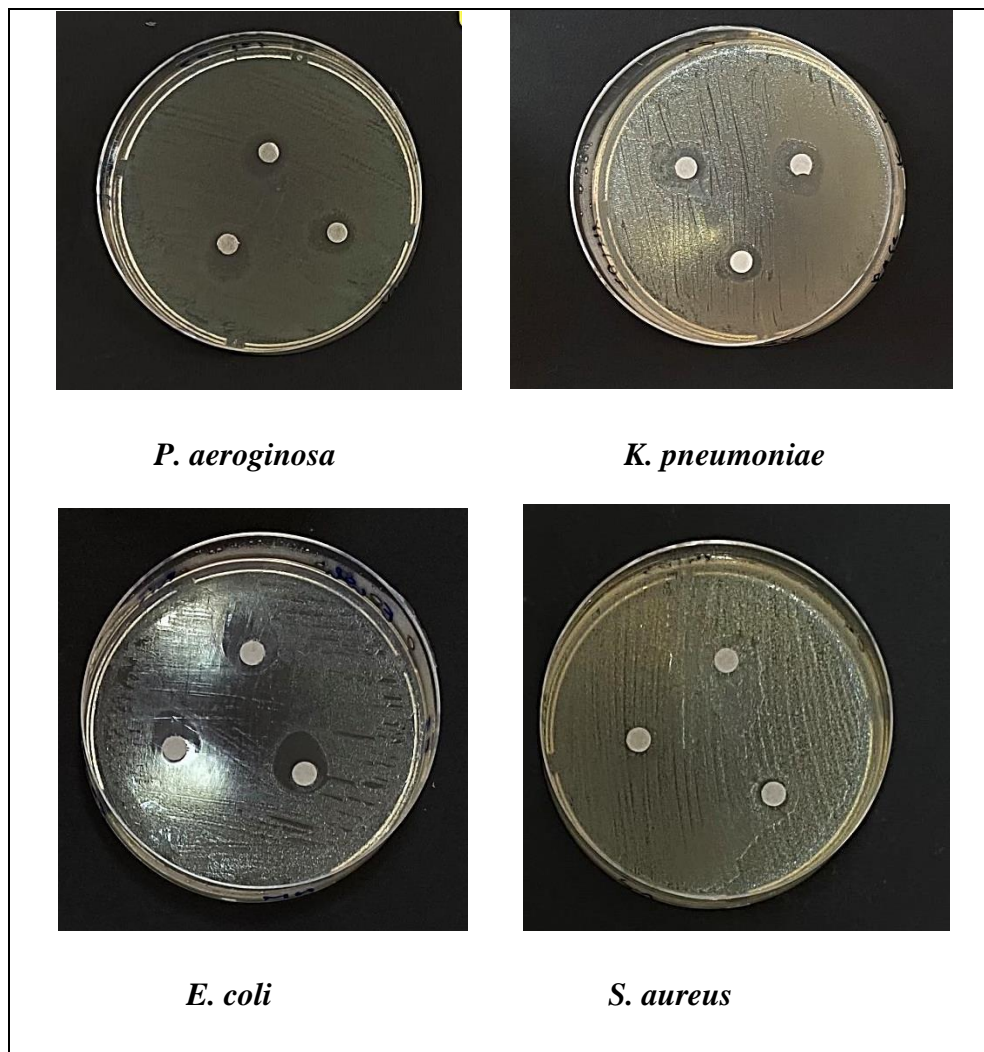


Figure 21. Effet du cocristal 3 pure sur les quatres souches bactériennes testées.

III.4. Détermination des concentrations minimales inhibitrice (CMI) et bactéricide (CMB)

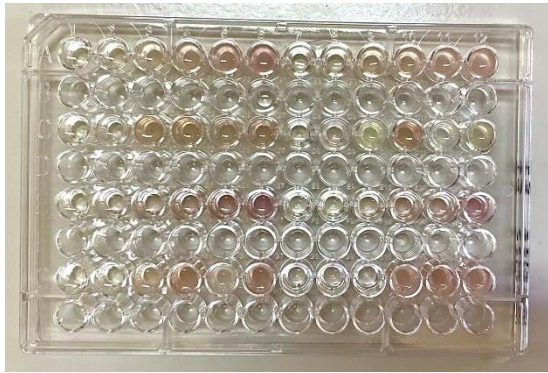
Après avoir déterminé l'activité antibactérienne sur milieu solide, une étude complémentaire se basant sur la détermination de la CMI et de la CMB en présence du réactif coloré (INT) s'est avérée indispensable.

La CMI est définie comme étant la concentration la plus faible de l'inhibition de la croissance bactérienne, elle est évaluée par la microdilution sur microplaques. Cette dernière a révélé des puits transparents et d'autres colorés en rose violet. Cette coloration est due à une concentration insuffisante du composé synthétisé, pour inhiber la croissance bactérienne, ceci dit que la bactérie est toujours vivante.

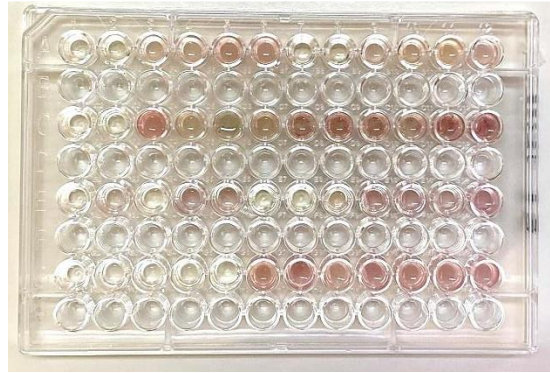
Les résultats obtenus de la CMI et de la CMB sont récapitulés dans le (**tableau 9**) et représentés sur la (**figure 22**).

Tableau 9. CMI (mg/ml) et CMB (mg/ml) obtenues par la méthode de microdilution vis-à-vis les quatre souches bactériennes.

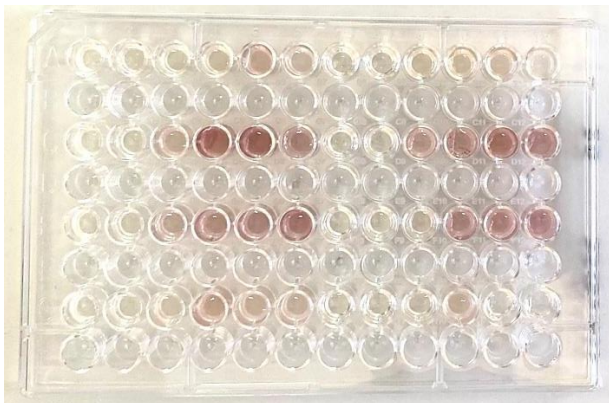
Cocristaux	Souches microbiennes	CMI (mg/ml)	CMB (mg/ml)
Cocristal 1	<i>E. coli</i>	3	>3
	<i>S. aureus</i>	3	>3
	<i>K. pneumonie</i>	3	>3
	<i>P. aeruginosa</i>	3	>3
Cocristal 2	<i>E. coli</i>	3.07	>3.07
	<i>S. aureus</i>	1.535	>1.535
	<i>K. pneumonie</i>	0.38	6.14
	<i>P. aeruginosa</i>	3.07	>3.07
Cocristal 3	<i>E. coli</i>	1.545	>1.545
	<i>S. aureus</i>	3.09	>3.09
	<i>K. pneumonie</i>	1.545	>1.545
	<i>P. aeruginosa</i>	3.09	6.18
Cocristal 4	<i>E. coli</i>	1.535	>1.535
	<i>S. aureus</i>	3.07	>3.07
	<i>K. pneumonie</i>	3.07	>3.07
	<i>P. aeruginosa</i>	3.07	>3.07
Cocristal 5	<i>E. coli</i>	3.04	>3.04
	<i>S. aureus</i>	3.04	>3.04
	<i>K. pneumonie</i>	1.515	>1.515
	<i>P. aeruginosa</i>	3.04	>3.04



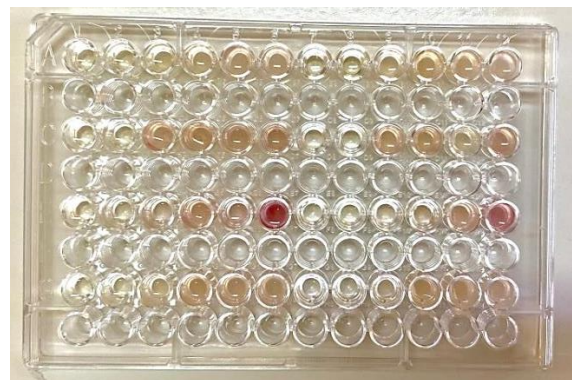
(a)



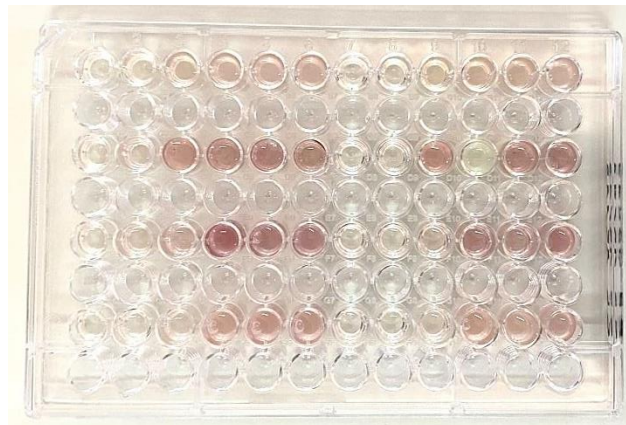
(b)



(c)



(d)



(e)

Figure 22. Détermination des CMI et CMB des cinq cocristaux étudiés vis-à-vis des quatre souches microbiennes : (a) cocristal 1, (b) cocristal 2, (c) cocristal 3, (d) cocristal 4, (e) cocristal 5.

Selon la littérature (N. Djabou et al, 2013) les bactéries sont :

- Résistantes lorsque leur CMI est comprise entre 25 et 50 mg/ml.
- Moyennement sensible (+) pour une valeur comprise entre 3 et 12.5 mg/ml.
- Sensibles (++) pour une CMI comprise entre 0.4 et 2 mg/ml.
- Extrêmement sensibles lorsque leur CMI est inférieure ou égale à 0.2 mg/ml.

Les concentrations minimales d'inhibition évaluées dans cette étude varient entre 0.38 et 3.09 mg/ml. Les souches bactériennes testées sont sensibles à moyennement sensibles.

Les séquences de sensibilité des bactéries sont comme suit :

- Agent antibactérien métronidazole/ Paracétamol : toutes les souches bactériennes testées présentent la même sensibilité à l'égard de cet agent avec une CMI de l'ordre de 3mg/ml. Par comparaison avec le métronidazole pur, nous pouvons constater que cet agent a un effet indifférent sur *E.coli* et *P.aeruginosa* et antagoniste sur le *Staphylococcus aureus* et *K.pneumoniae*.
- Agent antibactérien métronidazole/Nicotinamide : la *K.pneumoniae* est la plus sensible avec une CMI de l'ordre de 0.38 mg/ml. C'est une bactérie anaérobie sensible aux antibiotiques de la famille des imidazoles et leurs dérivés. Aussi, présente-il un effet de synergie sur *P.aeruginosa*, *S.aureus* et *K.pneumoniae*.
- Agent antibactérien métronidazole/ Leucine : les bactéries à gram négatif sont sensibles vis-à-vis cet agent, avec une CMI de 1.545 mg/ml. Le *S. aureus*, bactérie à gram positif ne présente pas la même sensibilité. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par la méthode de diffusion sur disque.
- Agent antibactérien métronidazole/ Proline : *E.coli* est la plus sensible avec une CMI de 1,54 mg/ml. Cet effet de synergie explique que l'effet antibactérien de cet agent est meilleur que celui du métronidazole pur. Par contre, il présente un effet antagoniste sur le staph, bactérie généralement résistante aux antibiotiques de la famille des imidazoles.
- Agent antibactérien métronidazole/ Arginine : Par comparaison avec le métronidazole pur, nous pouvons constater que cet agent a un effet indifférent sur *E.coli* et *P.aeruginosa* et antagoniste sur le *S. aureus* et *K.pneumoniae*.

La CMB permet de déduire la nature de l'antibiotique, il est bactéricide si cette concentration est égale à la CMI ou le rapport CMI/CMB est inférieur ou égale à 4. Il est bactériostatique

quand sa CMB est supérieure à sa CMI et le rapport $CMI/CMB > 4$. Nous pouvons déduire d'après nos résultats qu'aux concentrations prises, nos agents antibactériens se comportent comme bactériostatiques, à l'exception des cocristaux 2 et 3, qui sont bactéricides à une concentration de 6 mg/ml.

Conclusion

Ce travail s'inscrit dans le cadre d'un projet de recherche PRFU, portant sur la cocrystallisation des principes actifs, visant à améliorer leurs propriétés physico-chimiques et à augmenter leur activité biologique.

Le principe actif choisi dans cette étude est le métronidazole, un antibiotique et un antiparasitaire de la famille des 5-nitroimidazole, actif sur les souches bactériennes anaérobies. Cet antibiotique a subi une cocrystallisation par sa combinaison avec diverses molécules organiques, ne présentant aucun effet thérapeutique et se comportant comme coformeurs. Il s'agit en l'occurrence, du paracétamol, du nicotinamide, de la L-Leucine, de la L-Proline et de la L-Arginine. Quelques cocristaux synthétisés par broyage humide du principe actif-coformeur dans un rapport stœchiométrique 1 :1, ont été caractérisés par DSC, PXRD, SEM et FTIR.

L'activité antibactérienne des cocristaux élaborés a été déterminée par deux méthodes complémentaires : la méthode de diffusion en milieu solide et la microdilution en microplaques, permettant d'évaluer respectivement, le diamètre des zones d'inhibition et les concentrations minimales inhibitrice et bactéricides, sachant que les souches bactériennes choisies sont : l'*Escherichia coli*, le *Pseudomonas aeruginosa*, la *Klebsiella pneumoniae* et le *Staphylococcus aureus*.

Les résultats obtenus de la calorimétrie différentielle à balayage, montrent l'existence d'un seul accident thermique, s'expliquant par la formation d'un composé (cocrystal ou point eutectique) par des interactions physiques non covalentes. Ces résultats ont été confirmés par PXRD avec l'apparition de nouveaux pics, par MEB avec le changement de la morphologie et par FTIR avec l'apparition d'une bande intense vers 3500 cm⁻¹, correspondant à la liaison hydrogène intermoléculaire.

Les résultats de l'activité antibactérienne obtenus via les deux méthodes utilisées sont comparatifs.

L'activité antibactérienne des cocristaux, évaluée in vitro par la méthode de diffusion sur disque, vis-à-vis les quatre souches bactériennes testées, suit la séquence de réactivité :

Klebsiella pneumoniae* > *Escherichia coli* > *Pseudomonas aeruginosa* > *Staphylococcus aureus

D'après ces résultats, nous pouvons déduire que les cocristaux synthétisés dans ce travail agissent d'une manière semblable vis-à-vis des souches bactériennes spécifiques, c'est-à-dire ils manifestent un effet de synergie envers les bactéries à gram négatif et un effet antagoniste envers le *Staphylococcus aureus*, bactérie à gram positif.

Le cocrystal 3 est l'agent bactérien le plus puissant avec des diamètres d'inhibition compris entre 10 et 16 mm.

La détermination de la CMI nous a permis de déduire que les cocristaux issus des combinaisons métronidazole/acides aminés et métronidazole/nicotinamide, agissent en synergie avec le principe actif pur, sur la plupart des souches bactériennes testées. Ce résultat peut être traduit par la nature des groupements fonctionnels présents, qui sont en complémentarités structurale et électrostatique avec les sites actifs de l'ADN des bactéries. Ces groupements fonctionnels choisissent comme cible les protéines bactériennes en inhibant leur croissance.

La plus petite valeur de la concentration minimale d'inhibition de 0.38 mg/ml a été enregistrée en présence de l'agent antibactérien métronidazole/ Nicotinamide contre la *Klebsiella pneumoniae*. C'est une bactérie anaérobie sensible aux antibiotiques de la famille des imidazoles et leurs dérivés.

Les résultats de la CMB obtenus, montrent qu'aux concentrations prises, nos agents antibactériens se comportent comme bactériostatiques, à l'exception des cocristaux 2 et 3, qui sont bactéricides à une concentration de 6 mg/ml.

En perspectives

D'autres études pourraient être envisagées pour approfondir certains points abordés au cours de ce manuscrit.

Il serait donc, intéressant de :

- Synthétiser des cocristaux à partir d'une variété d'antibiotiques, appartenant à des familles différentes et agissant sur différentes cibles bactériennes, en présence de coformeurs de structures chimiques différentes, pour lutter contre la propagation des souches bactériennes résistantes en constante expansion.
- Evaluer leur solubilité dans une gamme de solvants alternatifs, comme les liquides ioniques.
- Déterminer leur activité antibactérienne vis-vis des bactéries multirésistantes.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

Aitipamula S, Banerjee R, Bansal AK, Biradha K, Cheney ML, Choudhury AR Polymorphs, salts, and cocrystals: what's in a name? 2012;12(5):2147-52.

B

Banerjee R, Bhatt PM, Ravindra NV, Desiraju G, design. Saccharin salts of active pharmaceutical ingredients, their crystal structures, and increased water solubilities. 2005;5(6):2299-309.

Bashimam M, El-Zein H. Pharmaceutical cocrystal of antibiotic drugs: A comprehensive review. 2022:e11872.

Bauer J, Spanton S, Henry R, Quick J, Dziki W, Porter W. Ritonavir: an extraordinary example of conformational polymorphism. 2001;18:859-66.

Berry DJ, Steed J. Pharmaceutical cocrystals, salts and multicomponent systems; intermolecular interactions and property based design. 2017;117:3-24.

Billot P, Hosek P, Perrin M-A, Development. Efficient purification of an active pharmaceutical ingredient via cocrystallization: From thermodynamics to scale-up. 2013;17(3):505-11.

Biscaia IFB, Gomes SN, Bernardi LS, Oliveira P. Obtaining cocrystals by reaction crystallization method: Pharmaceutical applications. 2021;13(6):898.

Bouskraoui M, Zouhair S, Soora N, Benaouda A, Zerouali K, Mahmoud M. Guide pratique des bactéries pathogène. 2017.

Bučar D, Filip S, Arhangelskis M, Lloyd G, Jones. Advantages of mechanochemical cocrystallisation in the solid-state chemistry of pigments: colour-tuned fluorescein cocrystals. 2013;15(32):6289-91.

C

Ceruelos AH, Romero-Quezada L, Ledezma JR, Contreras L. Therapeutic uses of metronidazole and its side effects: an update. 2019;23(1):397-401.

D

Dangoumau J. Pharmacologie Générale. Edition2006. 2006.

Djabou N, Lorenzi V, Guinoiseau E, Andreani S, Giuliani M-C, Desjobert J-M. Phytochemical composition of Corsican Teucrium essential oils and antibacterial activity against foodborne or toxi-infectious pathogens. 2013;30(1):354-63.

H

Hachem CY, Clarridge JE, Reddy R, Flamm R, Evans DG, Tanaka SK. Antimicrobial susceptibility testing of *Helicobacter pylori* comparison of E-test, broth microdilution, and disk diffusion for ampicillin, clarithromycin, and metronidazole. 1996;24(1):37-41.

I

Islam NU, Umar MN, Khan E, Al-Joufi FA, Abed SN, Said M, et al. Levofloxacin cocrystal/salt with phthalimide and Caffeic acid as promising solid-state approach to improve antimicrobial efficiency. 2022;11(6):797.

K

Kaakoush NO, Asencio C, Mégraud F, Mendz G, chemotherapy. A redox basis for metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. 2009;53(5):1884-91.

Kablan B, Adiko M, Abrogoua D. Évaluation in vitro de l'activité antimicrobienne de *Kalanchoe crenata* et de *Manotes longiflora* utilisées dans les ophtalmies en Côte d'Ivoire. 2008;6(5):282-8.

Korotkova EI, Kratochvíl B. Pharmaceutical cocrystals. 2014;10:473-6.

Kumar N, Rohilla RK, Roy N, Rawat D, letters mc. Synthesis and antibacterial activity evaluation of metronidazole–triazole conjugates. 2009;19(5):1396-8.

L

LA MJ-, Bahi C, Dje K, Loukou Y, Guede-Guina F. Étude de l'activité antibactérienne de l'extrait acétatique (EAC) de *Morinda morindoides* (Baker) milne-redheat (rubiaceae) sur la croissance in-vitro des souches d'*Escherichia coli* Study of the antibacterial activity of *Morinda morindoides* (Baker) milne-redheat (rubiaceae) acetatique extract (ACE) on in-vitro growth of *Escherichia coli* strains. 2008.

Li J, Hao X, Wang C, Liu H, Liu L, He X, et al. Improving the solubility, dissolution, and bioavailability of metronidazole via cocrystallization with ethyl gallate. 2021;13(4):546.

N

Neurohr Cm. Élaboration de cocristaux pharmaceutiques par procédés assistés au CO₂: Bordeaux; 2015.

R

Redigueri CF, Porta V, Nunes DS, Nunes TM, Junginger HE, Kopp S. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: metronidazole. 2011;100(5):1618-27.

S

Singh M, Barua H, Jyothi VGS, Dhondale MR, Nambiar AG, Agrawal AK. Cocrystals by Design: A Rational Coformer Selection Approach for Tackling the API Problems. 2023;15(4):1161.

T

Thayyil AR, Juturu T, Nayak S, Kamath S. Pharmaceutical co-crystallization: Regulatory aspects, design, characterization, and applications. 2020;10(2):203.

W

Whelan J, Hale J. Bactericidal activity of metronidazole against *Bacteroides fragilis*. 1973;26(6):393-5.

Y

Yaghoubi S, Zekiy AO, Krutova M, Gholami M, Kouhsari E, Sholeh M, et al. Tigecycline antibacterial activity, clinical effectiveness, and mechanisms and epidemiology of resistance: narrative review. 2021:1-20.

Z

Zheng K, Gao S, Chen M, Li A, Wu W, Qian S. Color tuning of an active pharmaceutical ingredient through cocrystallization: a case study of a metronidazole–pyrogallol cocrystal. 2020;22(8):1404-13.

Zheng K, Li A, Wu W, Qian S, Liu B, Pang Q. Preparation, characterization, in vitro and in vivo evaluation of metronidazole–gallic acid cocrystal: A combined experimental and theoretical investigation. 2019;1197:727-35.

ANNEXE

ANNEXE

Annexe 1 : Préparation de milieu de culture.

Milieu de culture	Propriété	Préparation
Mueller Hinton	Solide	38 g (MH) + 1 litre eau distillée
Bouillon de Mueller- Hinton	Liquide	21 g (MHB) + 1 litre eau distillée

Annexe 2 : Résultats des zones d'inhibition des différents cocristaux contre les quatre souches bactériennes.

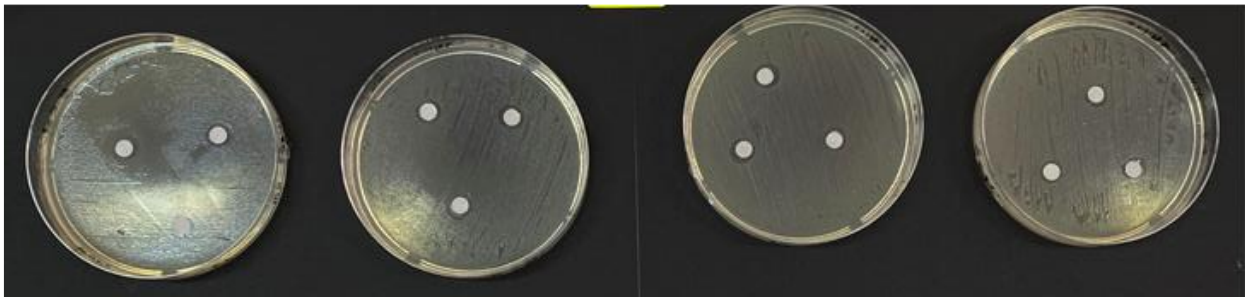


Photo représentatif des zones d'inhibition (Brut, 1/2, 1/5, 1/10) de cocristal 1 contre *E. coli*.

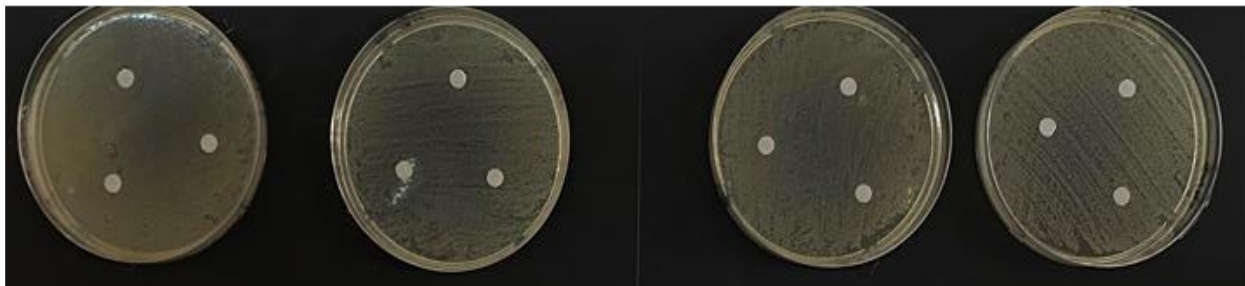


Photo représentatif des zones d'inhibition (Brut, 1/2, 1/5, 1/10) de cocristal 1 contre *S. aureus*.

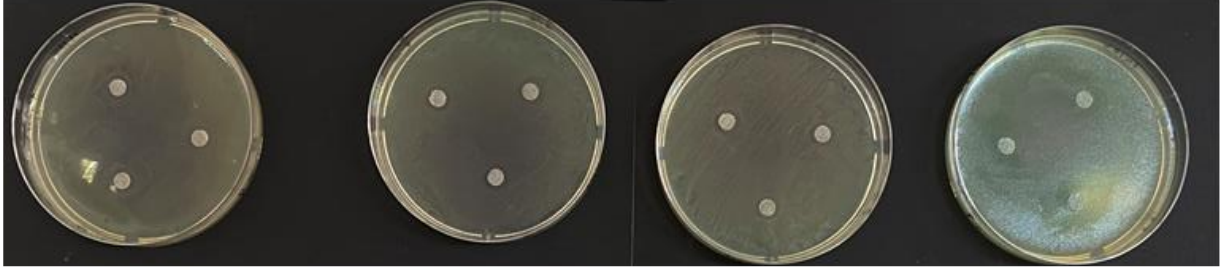


Photo représentatif des zones d'inhibition (Brut, 1/2, 1/5, 1/10) de cocrystal 1 contre *p. aeruginosa*.

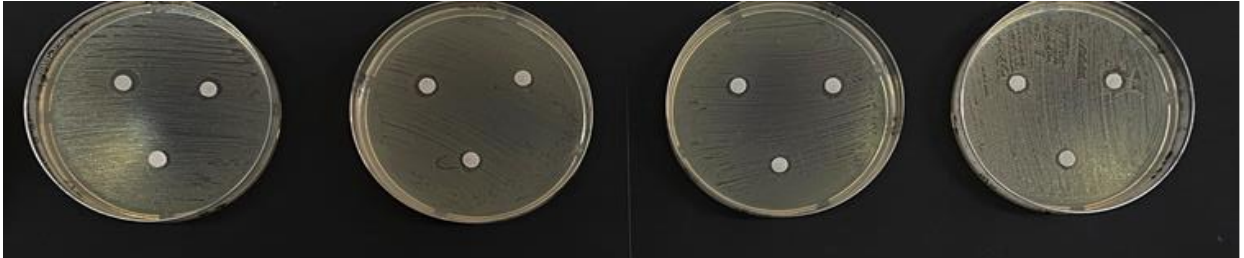


Photo représentatif des zones d'inhibition (Brut, 1/2, 1/5, 1/10) de cocrystal 1 contre *k. pneumoniae*.

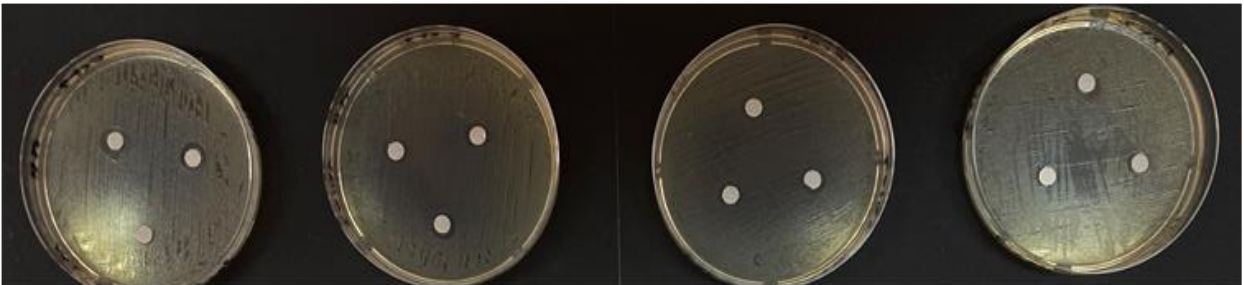


Photo représentatif des zones d'inhibition (Brut, 1/2, 1/5, 1/10) de cocrystal 2 contre *E. coli*.

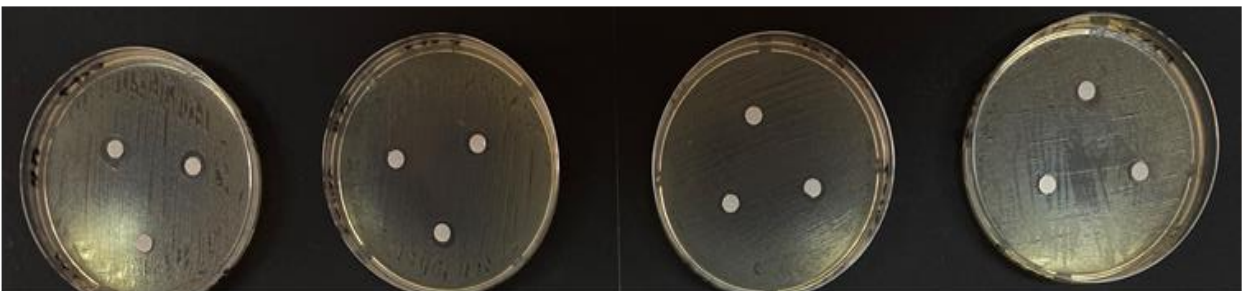


Photo représentatif des zones d'inhibition (Brut, 1/2, 1/5, 1/10) de cocrystal 2 contre *s. aureus*.

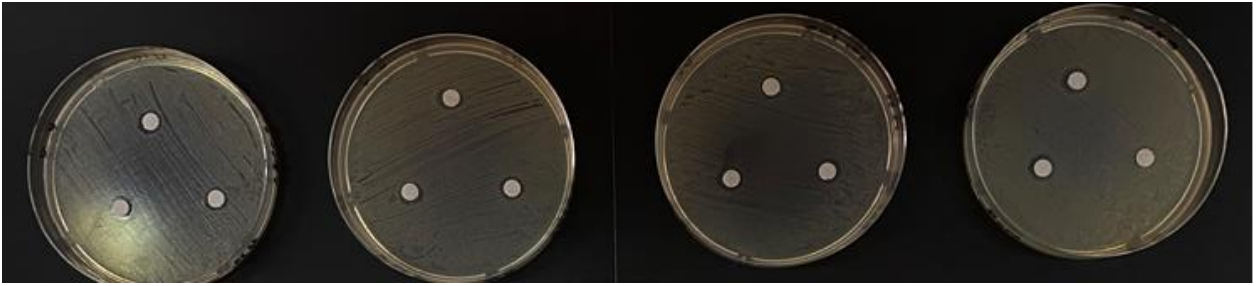


Photo représentatif des zones d'inhibition (Brut, 1/2, 1/5, 1/10) de cocrystal 2 contre *p. aeruginosa*.

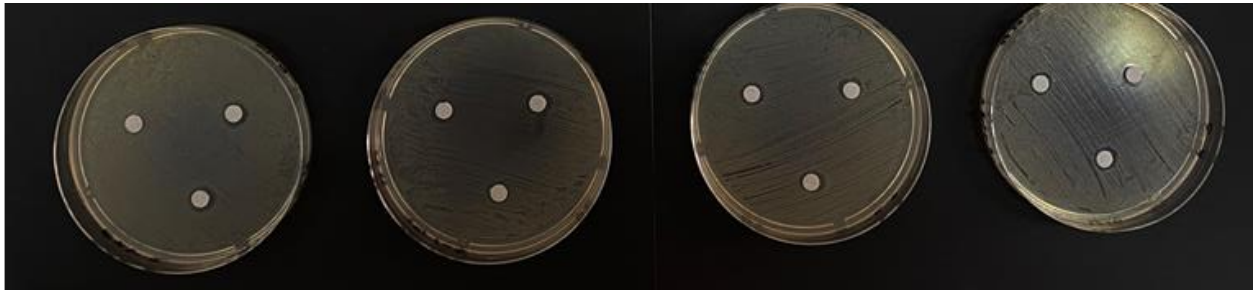


Photo représentatif des zones d'inhibition (Brut, 1/2, 1/5, 1/10) de cocrystal 2 contre *k. pneumoniae*.



Photo représentatif des zones d'inhibition (Brut, 1/2, 1/5, 1/10) de cocrystal 3 contre *E. coli*.

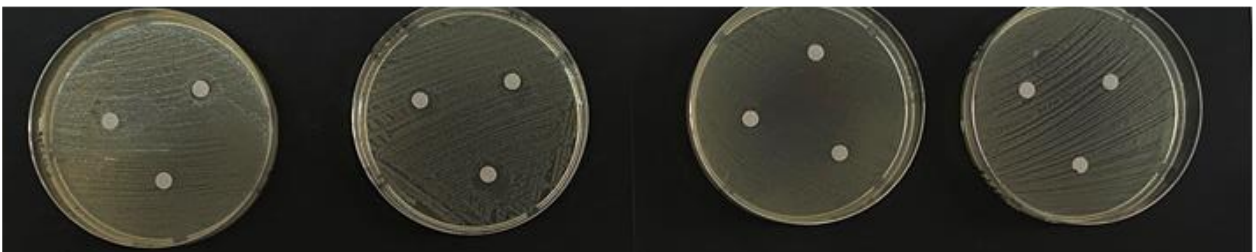


Photo représentatif des zones d'inhibition (Brut, 1/2, 1/5, 1/10) de cocrystal 3 contre *s. aureus*.



Photo représentatif des zones d'inhibition (Brut, 1/2, 1/5, 1/10) de cocrystal 3 contre *p. aeruginosa*.



Photo représentatif des zones d'inhibition (Brut, 1/2, 1/5, 1/10) de cocrystal 3 contre *k. pneumoniae*.

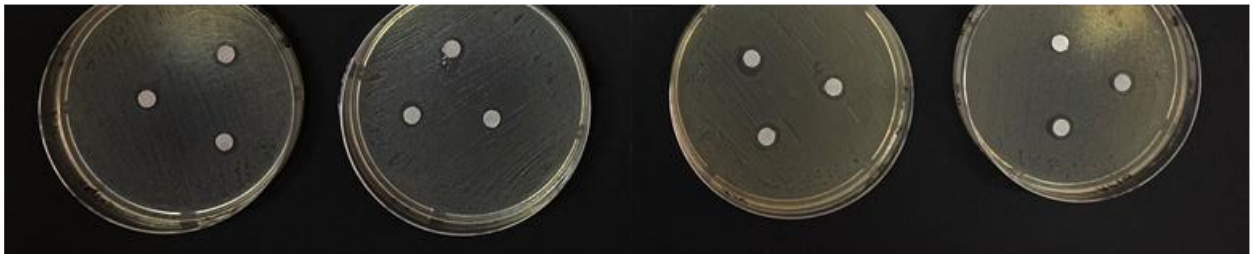


Photo représentatif des zones d'inhibition (Brut, 1/2, 1/5, 1/10) de cocrystal 4 contre *E. coli*.

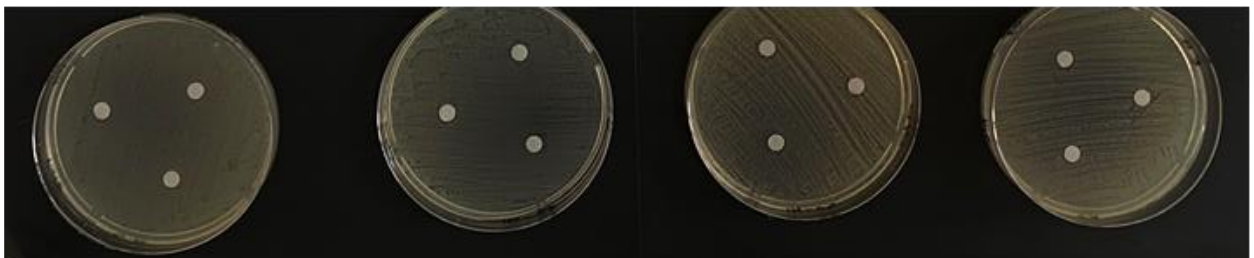


Photo représentatif des zones d'inhibition (Brut, 1/2, 1/5, 1/10) de cocrystal 4 contre *s. aureus*.

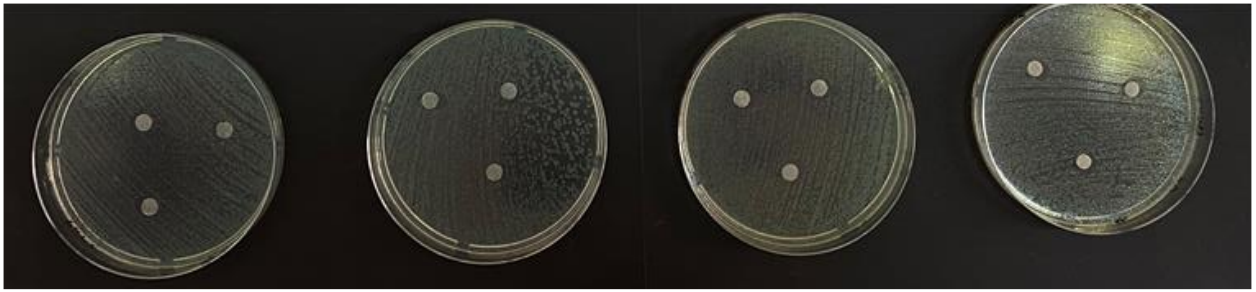


Photo représentatif des zones d'inhibition (Brut, 1/2, 1/5, 1/10) de cocrystal 4 contre *p. aeruginosa*.

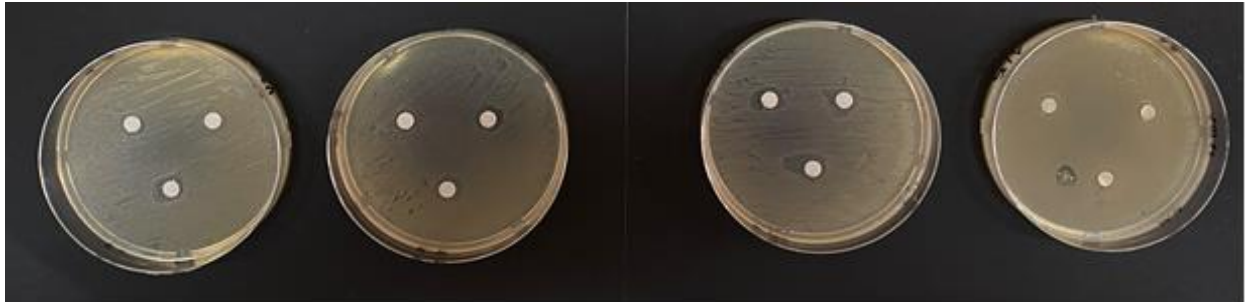


Photo représentatif des zones d'inhibition (Brut, 1/2, 1/5, 1/10) de cocrystal 4 contre *k. pneumoniae*.

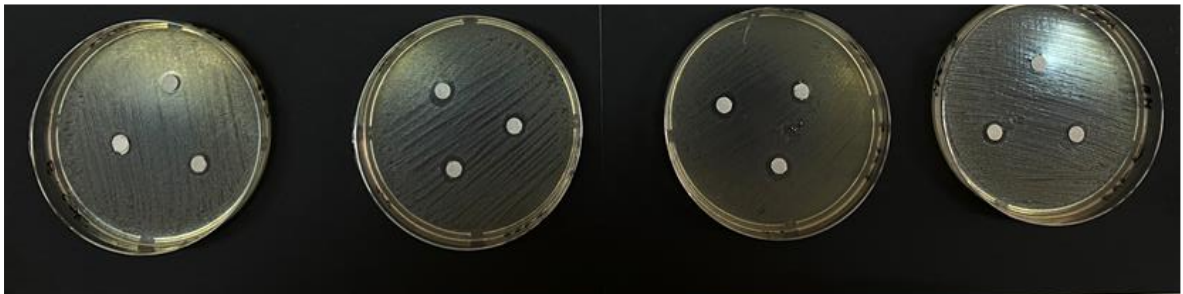


Photo représentatif des zones d'inhibition (Brut, 1/2, 1/5, 1/10) de cocrystal 5 contre *E. coli*.

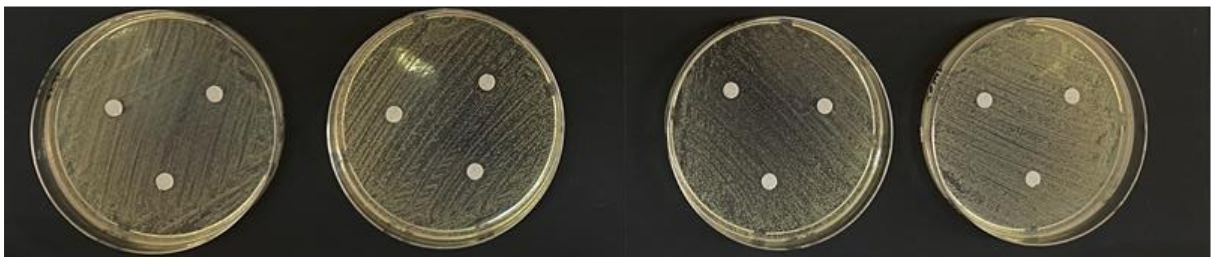


Photo représentatif des zones d'inhibition (Brut, 1/2, 1/5, 1/10) de cocrystal 5 contre *s. aureus*.

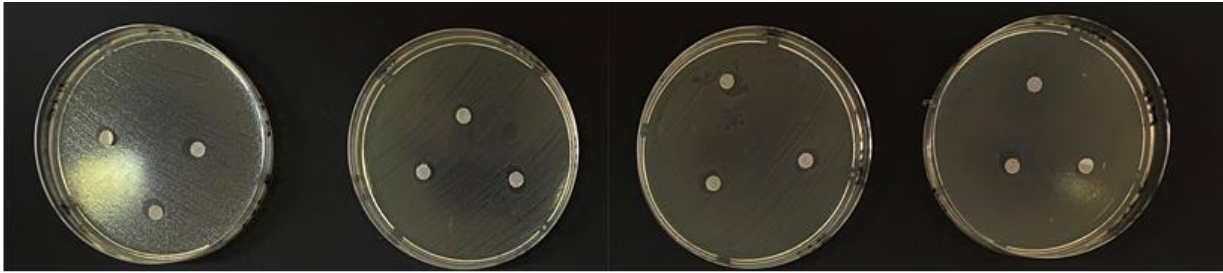


Photo représentatif des zones d'inhibition (Brut, 1/2, 1/5, 1/10) de cocrystal 5 contre *p. aeruginosa*.



Photo représentatif des zones d'inhibition (Brut, 1/2, 1/5, 1/10) de cocrystal 5 contre *k. pneumoniae*.

Annexe 3 : Les cinq cocristaux synthétisés.

Cocrystal 1	Métronidazole + Paracétamol
Cocrystal 2	Métronidazole + Nicotinamide
Cocrystal 3	Métronidazole + L- Leucine
Cocrystal 4	Métronidazole + L- Proline
Cocrystal 5	Métronidazole + Arginine

Annexe 4 : Matériels utilisés.

Ance de platine	Four pasteur
Autoclave	Microplaques
Bain-marie	PH mètre
Balance	Plaque chauffante agitatrice
Bec Bunsen	Porte tube
Bécher	Seringue
Boite de pétri	Spatule
Écouvillon	Spectrophotomètre
Entonnoir	Tubes à essai
Erlenmeyer	Verre de montre
Étuve	Vortex