

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

جامعة عمار ثليجي بالأغواط

UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOuat

كلية العلوم

FACULTE DES SCIENCES

قسم البيولوجيا

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Microbiologie Appliquée

THEME

***Inhibition, in vitro et in silico, de quelques souches
bactériennes d'origines hospitalières résistantes aux
antibiotiques***

Présenté par : Tali Chifa et Younes Malak

Jury:

M Zerrouki Mouhamed Hocine

M. Benamar Ibrahim

M. Messaoudi Omar

Présidente

Examineur

Rapporteur

MAA, Université de Laghouat.

MAB, Université de Laghouat.

MCB, Université de Laghouat.

Année universitaire : 2020– 2021

Remerciement

Avant tout, nous remercions Allah qui nous a donné la force et La puissance pour réaliser et achever ce travail . Nos remerciements les plus chaleureux et les plus vifs S'adreSSent d'abord à notre promoteur, Monsieur Messaoudi Omar , Pour son entière disponibilité et ses orientations ainsi que monsieur Benamar Ibrahim pour son Aide, et ses conseils. Nos remerciements les plus sincères au professeur Yousfi Mohamed de nous avoir accueilli d'une façon chaleureuse au niveau du laboratoire de recherche Des sciences fondamentales-Université de Laghouat- Nous remercions également, très sincèrement Nos enseignants pour leur soutien et leur dévouement durant Toutes noS annéeS d'étude. Nous témoignons notre reconnaissance à toute personne ayant Contribué de près ou de loin à la réalisation de notre mémoire.

Dédicaces

Je dédie ce travail :

A mes très chers parents qui ont toujours été là pour moi, et qui m'ont donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance .J'espère qu'ils trouveront dans ce travail toute ma reconnaissance et tout mon amour

A ma très chère sœur khadidja et son mari ismail

À Me s très chers frères et leur fammes

Votre aide, votre générosité, votre soutien ont été pour moi une source decourage et de confiance. Je prie Allah de vous protéger, vous garder et vous procurer santé et bonheur

Aux petits bijoux qui ont éclairé, orné et apporté joie à notre famill : amine et tassnime

A mon chère fiancé

A Toute ma famille Younes , geuribize et Mordjana

A Tous mes Amis

Younes Malak

Je dédie ce modeste travail :

A mes parents pour leur amour et leur support continu.

A ceux qui m'ont tout donné sans rien en retour.

A ceux qui m'ont encouragé et soutenu dans moments les

Plus difficiles.

A mes frères et toute ma famille, sans oublier les amis.

Tali chifa

Résumé

Récemment, la propagation rapide de la résistance aux antibiotiques bêta-lactames à large spectre dans les souches bactériennes pathogènes est devenue un problème de santé mondial majeur. Ces nouvelles résistances émergentes provoquent l'inefficacité des antibiotiques et augmentent la gravité des maladies et les coûts de traitement. Parmi des cibles de résistance diverses et variées, nous avons choisi une bêta-lactamase de classe A, SHV-1, dans le but d'identifier de nouvelles molécules qui ont une activité inhibitrice contre cette enzyme. L'objectif de cette étude était d'évaluer les propriétés antibactériennes des extraits de 3 plantes Médicinales « *Artemisia campestris*, *Artemisia herba alba* et *Piper betle* », qui ont une abondance de flavonoïdes, de tanins et d'alcaloïdes ce qui lui donne une grande valeur potentielle contre les bactéries résistantes par BLSE. Les plantes d'*Artemisia* ont été étudiées au niveau du laboratoire (étude in vitro) sur 7 souches d'origine hospitalière (*Pseudomonas aeruginosa* (L4), deux souches de *Klebsiella pneumoniae* (S35 et F40) et une souche de référence *Klebsiella pneumoniae* Atcc7006030, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*, alors que concernant la plante *Piper betle* nous avons effectué une étude in silico. Les résultats de l'étude in vitro ont montré que les deux extraits méthanoliques de deux plantes *Artemisia campestris* et *Artemisia herba alba* ne présentent aucune activité sur les souches de *Klebsiella pneumoniae*, et *Pseudomonas aeruginosa*, par contre, nous avons remarqué une activité inhibitrice moyenne chez les deux extraits méthanoliques des deux plantes contre *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*. Alors que les résultats d'arrimage moléculaire (in silico) nous ont montré que la molécule « Rutine » possède une excellente activité inhibitrice contre l'SHV bêta-lactamase mais elle ne présente aucune similarité médicamenteuse selon la règle de cinq Lipinski et les paramètres de toxicité et des ADME.

Abstract

Recently, the rapid spread of broad-spectrum beta-lactam antibiotic resistance in pathogenic bacterial strains has become a major global health problem. These new emerging resistances are causing antibiotic ineffectiveness and increasing disease severity and treatment costs. Among various resistance targets, we chose a class A beta-lactamase, SHV-1, in order to identify new molecules with inhibitory activity against this enzyme. The objective of this study was to evaluate the antibacterial properties of extracts of 3 medicinal plants " *Artemisia campestris*, *Artemisia herba alba* and *Piper betle*, which have an abundance of flavonoids, tannins and alkaloids. which gives it a great potential value against ESBL resistant bacteria. *Artemisia* plants have been studied in the laboratory (in vitro study) on 7 strains of hospital origin

(*Pseudomonas aeruginosa* (L4), two strains of *klebsiella pneumoniae* (S35 and F40) and a reference strain *Klebsiella pneumoniae* Atcc7006030, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*, while concerning the plant *Piper betle* we have carried out an in silico study. The results of the in vitro study showed that the two methanolic extracts of the two plants *Artemisia campestris* and *Artemisia herba alba* did not present any activity on the strains of *klebsiella pneumoniae*, and *Pseudomonas aeruginosa*, while a medium inhibitory activity was noticed in the two methanolic extracts of the two plants against *Bacillus ceureus* , *staphylococcus aeureus* , *micrococcus luteus*. While the results of molecular docking (in silico) showed us that the molecule "Rutin" has an excellent inhibitory activity against VHS beta-lactamase but it does not present any drug similarity according to the Lipinski five rule and the parameters of toxicity and ADME.

ملخص

في الآونة الأخيرة ، أصبح الانتشار السريع لمقاومة المضادات الحيوية بيتا لاكتام واسعة النطاق في السلالات البكتيرية المسببة للأمراض مشكلة صحية عالمية كبرى. تسبب هذه المقاومات الناشئة الجديدة عدم فعالية المضادات الحيوية وزيادة شدة المرض وتكاليف العلاج. من بين أهداف المقاومة المختلفة ، ، من أجل تحديد الجزيئات الجديدة ذات A bêta-lactamase SHV-1 اخترنا فئة النشاط المثبط ضد هذا الإنزيم. الهدف من هذه الدراسة هو تقييم الخصائص البيطيين الهندي ، ، الشيخ و المضادة للبكتيريا لمستخلصات 3 نباتات طبية هي: الدقفت والتي تحتوي على وفرة من مركبات الفلافونويد والعفص والكلويدات مما يعطيها قيمة كبيرة ضد البكتيريا المقاومة ب بيتا لاكتام واسعة النطاق تمت دراسة نباتات الشيخ في المختبر (دراسة في المختبر) على 7 سلالات مستشفيات ، سلالة من (وسلالة مرجعية F40 و S35) *klebsiella pneumoniae* ، سلالتين من *Pseudomonas aeruginosa* (*Bacillus cereus* و *Staphylococcus aureus* ، *Micrococcus luteus* ، *Klebsiella pneumoniae* Atcc7006030 ، المحاكات بالحاسوب . وأظهرت البيطيين الهندي ، أجرينا دراسة في عن طريق فيما يتعلق بنبات نتائج الدراسة في المختبر أن المستخلصين الميثانوليين للنباتين الدقفت و *Pseudomonas aeruginosa* و *klebsiella pneumoniae* الشيخ لم يقدموا أي نشاط على سلالات من بينما لوحظ نشاط مثبط متوسط في المستخلصين الميثانوليين من النباتات ضد . في حين أظهرت *micrococcus luteus* ، المكورات العنقودية الذهبية ، *Bacillus ceureus* لنا نتائج الالتحام الجزيئي (في السيليكو) أن جزيء "روتين" له نشاط مثبط بيتا لاكتاماز ولكنه لا يقدم أي تشابه بين الأدوية وفقًا لقاعدة VHS ممتاز ضد ADME ومعايير السمية و Lipinski 5.

Table de matière

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction générale02

Synthèse Bibliographique

1. Généralités sur *Klebsiella pneumoniae*05

1.1. Position taxonomique.....05

1.2. Caractères bactériologique.....05

1.2.1. Caractères morphologiques.....05

1.2.2. Caractères cultureux.....05

1.2.3. Caractères biochimiques.....05

1.3. Pouvoir pathogène.....06

2. Généralités sur *Pseudomonas aeruginosa*.....06

2.1. Position taxonomique.....06

2.2. Caractères bactériologique.....07

2.2.1. Caractères morphologiques.....07

2.2.2. Caractères cultureux.....07

2.2.3. Caractères biochimiques.....07

2.3. Pouvoir pathogène.....08

3. Les antibiotiques.....08

3.1. Définition.....08

3.2. Classification et mode d'action.....09

3.3. La famille des β - lactamines	10
3.3.1. Définition.....	10
3.3.2. Structure et classification.....	12
3.3.2.1. Les pénicillines.....	12
3.3.2.2. Les carbapénèmes.....	12
3.3.2.3. Les céphalosporines.....	13
3.3.2.4. Les monobactames.....	13
3.3.3. Mode d'action des β -lactamines.....	13
3.4. Mécanismes de résistance par Beta lactamase.....	14
3.4.1. Bêta-lactamases.....	14
3.4.2. Classification.....	14
3.4.2.1. La classification de Ambler dite structurale.....	14
3.4.2.2. La classification de Bush dite fonctionnelle.....	14
3.4.3. Structure des Bêta-Lactamases	15
3.4.4. Les β -lactamases à spectre étendu (BLSE).....	16
3.4.4.1.Définition des BLSE.....	16
3.4.4.2.Types des BLSE.....	16
4. Résistance de <i>K. pneumoniae</i> aux β-lactamines	17
4.1. Types de résistance	17
4.1.1. Résistance naturelle.....	17
4.1.2. Résistance acquise.....	17
5. Résistance de <i>P. aeruginosa</i> aux antibiotiques.....	17
5.1. Types de résistance aux antibiotique.....	17
5.1.1. Résistance naturelle.....	17
5.1.2. Résistance acquis.....	18
5.2. Mécanismes de résistance par Beta lactamase à spectre étendu (BLSE).....	18

6. inhibition des β- lactamases par les plantes médicinale.....	18
6.1. La plante <i>Artemisia campestris</i>	18
6.1.1. Systématique de la plante.....	18
6.1.2. Nomenclature de la plante.....	19
6.1.3. Description botanique.....	19
6.1.4. distribution géographique	20
6.1.5. Composition chimique.....	20
6.1.5.1. Flavonoïdes.....	20
6.1.5.2. Acides phénoliques.....	24
6.1.5.3. Coumarines et isocoumarines.....	24
6.1.5.4. Terpène.....	25
6.1.6. L'utilisation traditionnelle d' <i>Artemisa campestris</i>	26
6.1.7. Activité antimicrobienne	27
6.2. La plante <i>Artemisia herba alba</i>	27
6.2.1. Présentation de la plante.....	27
6.2.2. Systématique de la plante.....	28
6.2.3. Nomenclature de la plane.....	28
6.2.4. Description botanique.....	29
6.2.5. Distribution géographique.....	29
6.2.6. Composition chimique.....	29
6.2.6.1. Les lactones de Sesquiterpène.....	29
6.2.6.2. Les flavonoïdes.....	30
6.2.7. Utilisation thérapeutique de la plante.....	31
6.2.8. Activité antibactérienne.....	31
 Synthèse des travaux effectué pour inhibé les bactéries résistante Par BLSE (entre 2007-2020)	 32

Docking moléculaire.....	33
1.Introduction.....	33
2. Les outils du Docking moléculaire	34
2.1. Les Récepteurs.....	34
2.2. Le(s) ligand(s).....	34
2.3.PubChem	35
2.4. Drugbank.....	35
2.5. SwissADME	35
2.6. PreADMET	35
2.7. Programmes.....	36

Matériels et méthodes

Première partie : étude in vitro

1.Préparation du matériel végétal	39
2.Préparation des extraits brut de é plantes.....	39
3. Détermination du rendement.....	40
4. Etude de l'activité antibactérienne.....	40
4.1. les souches bactériennes testée.....	40
4 .2. Les mileus de cultures utilisé	41
4.3. Préparation d'inoculum.....	41
4.4. Préparation de dilution d' <i>A campestris</i>	42
4.5. Préparation de dilution d' <i>A herba halba</i>	42
4.6. Technique de diffusion sur gélose (méthode de puits).....	42
5 . Etude de l' activité antibiofilme.....	43

Résultats et Discusion

1.Le rendements de l'extrait méthanolique d' <i>A campestris</i>	46
2.Le rendements de l'extrait méthanolique d' <i>A herba halba</i>	46
3.La concentration de l'extrait méthanolique d' <i>A campestris</i>	46
4.La concentration de l'extrait méthanolique d' <i>A herba halba</i>	46
5.Evaluation de l'activité antibactérienne.....	47
5.1.La croissance des souches.....	47
5.2.Technique de diffusion sur gélose (méthode de puits).....	48
5.2.1.L'activité de l'extrait méthanolique d' <i>A campestris</i>	50
5.2.2.L'activité de l'extrait méthanolique d' <i>A herba halba</i>	50
6.Evaluation de l'activité antibiofilm	53

Deuxième partie : étude in silico

1. Matériels	60
1.1. Microordinateurs.....	60
1.2 .Programme	60
1.3. Banques de données	60
2. Méthodes	61
2.1. Préparation de la protéine SHV-1 Beta lactamase	61
2.2. Préparation des ligand.....	62
2.3. Docking Moléculaire.....	62

Résultats et Discusion

Coclusion.....	83
-----------------------	-----------

Références bibliographiqu

Liste des Tableaux

Tableau	Titre	Page
Tableau 01	Classification de <i>Klebsiella pneumoniae</i> selon Bergey	05
Tableau 02	Classification de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> selon Bergey	07
Tableau 03	classification des bêta-lactamases d'Ambler et Bush-Jacoby-Medeiros(28)	15
Tableau 04	quelques types de BLSE	16
Tableau 05	Principaux programmes du docking moléculaire	37
Tableau 06	Diamètre des zone d'inhibition	52
Tableau 07	les paramètres de La GRID BOX pour la protéine SHV-1	63
Tableau 08	Interactions d'amarrage Avibactam -SHV-1	66
Tableau 09	Interactions d'amarrage Avibactam -SHV-1	67
Tableau 10	interactions d'amarrage P-coumaric Acid -SHV-1	68
Tableau 11	interactions d'amarrage Quercetin -SHV-1	69
Tableau 12	interactions d'amarrage Rutin-SHV-1	70
Tableau 13	interactions d'amarrage Sinapic acid-SHV-1	71
Tableau 14	interactions d'amarrage Syringic acid-SHV-1	72
Tableau 15	interactions d'amarrage Apignin-SHV-1	73
Tableau 16	interactions d'amarrage Catechin--SHV-1	74
Tableau 17	interactions d'amarrage Eugenol-SHV-1	75
Tableau 18	interactions d'amarrage Gallic acid-SHV-1	76
Tableau 19	interactions d'amarrage Caffeic acid -SHV-1	77
Tableau 20	interactions d'amarrage Ferulic acid -SHV-1	78
Tableau 21	interactions d'amarrage Myricetin -SHV-1	79
Tableau 22	Le profil ADME relative de la molécule Rutin obtenus à partir de serveur swissADME	82

Liste des figures

Figure	Titre	Page
Figure 01	Ciliature monotriche de <i>P. aeruginosa</i>	08
Figure 02	les différents types de mécanismes de résistance aux β -lactamines (1) : Modification du site des PBP liant les antibiotiques Bêta – Lactame (2) : Inactivation enzymatique par les Bêta-Lactamases (3) : les phénomènes d'imperméabilité et d'efflux	10
Figure 03	Cycle d'un anneau β -lactame et les structures du noyau de base des β -lactamines (21)	12
Figure 04	La structure cristallographique aux rayons X de la bêta-lactamase SHV-1 pdb	15
Figure 05	<i>Artemisia campestris</i>	19
Figure 06	structure chimique de base des Flaconoïdes	20
Figure 07	Structures chimiques des flavones identifiés dans <i>A.campestris</i> L	21
Figure 08	Structures chimiques des flavonols identifiés dans <i>A.campestris</i> L.	23
Figure 09	structure chimique d'acide phénolique et ses dérivé	24
Figure 10	sturucture chimique des coumarines, isocoumarines	25
Figure 11	sturucture chimique des monoterpène	25
Figure 12	sturucture chimique des sesquiterpene	26
Figure 13	<i>Artemisia herba- alba</i>	28
Figure 14	Lactones sesquiterpéniques d' <i>Artemisia herba-alba</i> poussant en Algérie	30
Figure 15	les Les flavonoïdes d' <i>Artemisia herba-alba</i>	31
Figure 16	Représentation schématique du docking moléculaire	33
Figure 17	Comparaison des programmes de docking les plus cités	36
Figure 18	Étapes typiques d'un docking	37
Figure 19	Extraction par macération	39

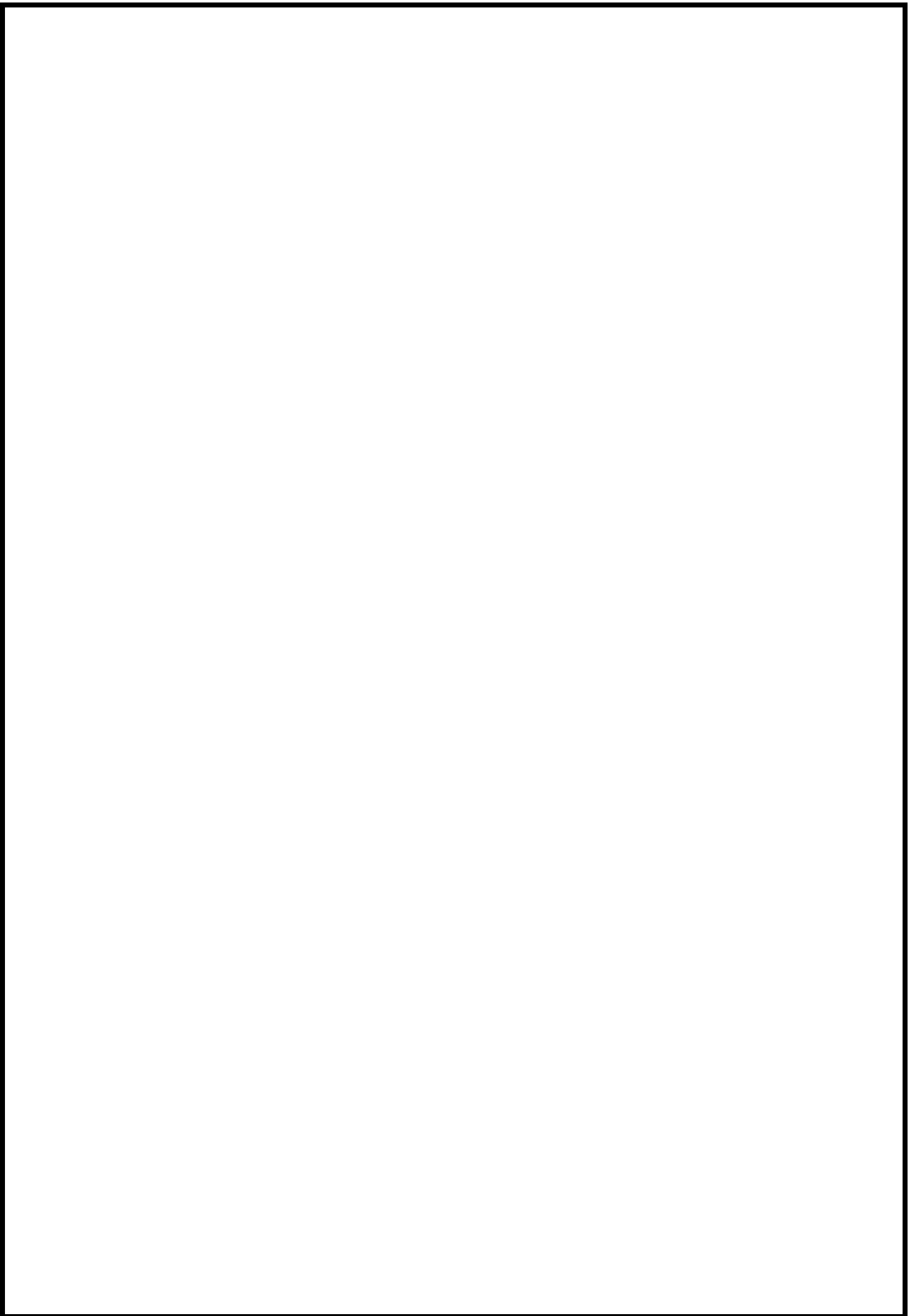
Figure 20	évaporation des extraits par un évaporateur rotatif	40
Figure 21	représente la protocole dans microplaque 96 puits	44
Figure 22	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , Souche de référence <i>Klebsiella pneumoniae</i> Atcc7006030 en mackonky	47
Figure 23	<i>Bacillus ceureus</i> en gélose nutritive, <i>staphylococcus aeureus</i> en chapman	47
Figure 24	<i>klebsiella pneumoniae</i> s35 , <i>klebsiella pneumoniae</i> f40	47
Figure 25	représentation des souche bactérienne cultivé dans le BHIB après l'incubation, <i>staphylococcus aeureus</i> , <i>Bacillus ceureus</i> , <i>micrococcus luteus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>klebsiella pneumoniae</i> s35, <i>klebsiella pneumoniae</i> F40 , et la Souche de référence <i>Klebsiella pneumoniae</i> Atcc7006030)	48
Figure 26	activité antimicrobienne d' <i>Artemisia campestris</i> sur <i>micrococcus luteus</i>	49
Figure 27	activité antimicrobienne d' <i>Artemisia campestris</i> sur <i>Bacillus ceureus</i> (a gauche), et sur <i>staphylococcus aeureus</i> .(a droit)	49
Figure 28	activité antimicrobienne d' <i>Artemisia campestris</i> sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , et <i>Klebsiella pneumoniae</i> Atcc7006030)	49
Figure 29	activité antimicrobienne d' <i>Artemisia campestris</i> sur sur <i>Klebsiella pneumoniae</i> S 35et F40	50
Figure 30	activité antimicrobienne d' <i>Artemisia herba alba</i> sur <i>micrococcus luteus</i>	50
Figure 31	activité antimicrobienne d' <i>Artemisia herba alba</i> sur <i>staphylococcus aeureus</i> (a gauche), et <i>Bacillus ceureus</i> .(a droite)	51
Figure 32	activité antimicrobienne d' <i>Artemisia herba alba</i> sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>klebsiella pneumoniae</i> Atcc7006030	51
Figure 33	activité antimicrobienne d' <i>Artemisia herba alba</i> sur <i>klebsiella pneumoniae</i> f40, <i>klebsiella pneumoniae</i> s35	51
Figure 34	résultat d'activité anti biofilm	53
Figure 35	L'interface graphique AutoDock Tools.	60
Figure 36	Interface d'accueil du PDB et PubChem	61

Figure 37	structure de SHV-1 non simplifié (1) et simplifiée (2)	62
Figure 38	positionnement du ligand dans grille tridimensionnelle du site actif	63
Figure 39	Représentation 2D et 3D du positionnement du Kaempferol dans le site actif de SHV-1 Bêta-Lactamase	67
Figure 40	Représentation 2D et 3D du positionnement du P-coumaric Acid dans le site actif de SHV-1 Bêta-Lactamase	68
Figure 41	Représentation 2D et 3D du positionnement du Quercetin dans le site actif de SHV-1 Bêta-Lactamase	69
Figure 42	Représentation 2D et 3D du positionnement du Rutin dans le site actif de SHV-1 Bêta-Lactamase	70
Figure 43	Représentation 2D et 3D du positionnement du Sinapic acid dans le site actif de SHV-1 Bêta-Lactamase	71
Figure 44	Représentation 2D et 3D du positionnement du Syringic acid dans le site actif de SHV-1 Bêta-Lactamase	72
Figure 45	Représentation 2D et 3D du positionnement du Apignin dans le site actif de SHV-1 Bêta-Lactamase	73
Figure 46	Représentation 2D et 3D du positionnement du Catechin dans le site actif de SHV-1 Bêta-Lactamase	74
Figure 47	Représentation 2D et 3D du positionnement Eugenol dans le site actif de SHV-1 Bêta-Lactamase	75
Figure 48	Représentation 2D et 3D du positionnement du Gallic acid dans le site actif de SHV-1 Bêta-Lactamase	76
Figure 49	Représentation 2D et 3D du positionnement du Caffeic acid dans le site actif de SHV-1 Bêta-Lactamase	77
Figure 50	Représentation 2D et 3D du positionnement du Ferulic acid dans le site actif de SHV-1 Bêta-Lactamase	78
Figure 51	Représentation 2D et 3D du positionnement myricetin dans le site actif de SHV-1 Bêta-Lactamase	79

Abréviations

Abréviations	Nome complet
PLP	protéines liant la pénicilline
BGN	bactéries à Gram négatif
DNA	deoxyribonucleic acid
ESBL	bactéries productrices de bêtalactamase avec spectre élargi
CTX	Céfotaximase
SHV	Sulfhydryl reagent variable
AER	Aeromonas
TEM	Temoneira
PIT	Pitton
MBL	Métallo-beta-lactamase
OXA	Oxacilline
ARN	Acide ribonucléique
PDB	Protein Data Bank
RMN	Résonance magnétique nucléaire
NCBI	National Center for Biotechnology Information
R	Rendement
C	Concentration
BHIB	Brain Heart Infusion
MDR	Multiple drug resistance
HPLC-DAD	liquid chromatography (HPLC) with a diode-array detector
Ser	Sérine
Asp	Acide aspartique

Arg	Arginine
Thr	Thréonine
Ala	Alanine
Ile	Isoleucine
Leu	Leucine
Asn	Asparagine
Val	Valine
Phe	Phénylalanine



Introduction

Les infections nosocomiales ou associées aux soins à bactéries multi-résistantes, représentent un problème majeur de santé publique. Elles sont responsables d'une morbi-mortalité, d'une durée de séjour et d'un coût très élevé. En réanimation, la surveillance des infections nosocomiales ou associées aux soins est devenue une obligation, car les patients ont un risque infectieux plus élevé du fait de leur état critique et des dispositifs invasifs souvent utilisés. De plus, ces infections sont souvent dues à des bactéries résistantes aux antibiotiques.(101)

Les antibiotiques exercent une pression de sélection naturelle sur les populations bactériennes à l'origine de l'émergence de plus en plus fréquente de bactéries résistantes. Ce problème majeur de santé publique est fortement lié au mésusage et à la surconsommation des antibiotiques en santé humaine et animale, accentués par la diffusion des antibiotiques et bactéries résistantes dans l'environnement. La prévention de la résistance doit donc être globale avec des leviers d'action multiples(102). Parmi ces bactéries mentionnons *Pseudomonas aeruginosa*, *klebsiella pneumoniae*, De nombreuses épidémies nosocomiales causées par cette bactérie ont été décrites, notamment chez les personnes ayant un système immunitaire affaibli, comme les diabétiques et les alcooliques. Elle peut se propager rapidement entre les patients hospitalisés surtout dans des unités de soins intensifs adultes ou pédiatriques(31). Les deux bactéries développé plusieurs mécanisme de résistance, L'un des mécanismes de résistance très répandu est l'inactivation enzymatique de l'antibiotique. Par exemple, la bactérie peut acquérir des gènes de résistance codant des enzymes nommées β -lactamases et capables d'hydrolyser le noyau β -lactame des β -lactamines, les transformant en produits inactifs. il y a une grande diversité des β -lactamases impliquées dans des résistances naturelles (TEM, SHV) et acquises (CTX-M, TEM, SHV, KPC, OXA, NDM) aux antibiotiques. D'importance notable sont les bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE) de *Klebsiella pneumoniae* médiate la résistance aux céphalosporines de troisième génération et à l'aztréonam (AZT).(103)

Artemisia campestris et *Artemisia herba alba* est largement utilisée en médecine traditionnelle particulièrement comme décoction pour ses propriétés antivenimeuses, anti-inflammatoires, antirhumatismales, pour le traitement des ulcères, des troubles digestifs des brûlures, de la diarrhée et d'autres maladies. Les deux plants sont riches en flavonoïdes, en acides phénoliques et en composés terpéniques. Elle présenté plusieurs activité biologique comme activité antioxydant, antimicrobienne.(104)

Les objectifs de ce travail:

- Inhibé l'activité enzymatique de bêta-lactamase à spectre élargi produit par *Pseudomonas aeruginosa*, et *klebsiella pneumoniae* par l'extrait méthanolique brut d'*Artemisia campestris* et d'*Artemisia herba alba*.
- Déterminé la molécule et les molécules impliqué dans l'inhibition de l'enzyme de bêta- lactamase à spectre élargi. (étude virtuelle par logiciel auto dock vina).

Ce manuscrit s'articule autour de 2 parties :

- Etude in vitro : évaluations l'activité antimicrobienne et l'activité antibiofilm d'extrait méthanolique brut d'*Artemisia campestris* et d'*Artemisia herba alba*, sur *Pseudomonas aeruginosa*, et *klebsiella pneumoniae*.
- Etude in silico : recherche des molécules possède une forte activité inhibitrice contre l'activité enzymatique de bêta-lactamase de *klebsiella pneumoniae* .

Etude Bibliographique

1. Généralités sur *Klebsiella pneumoniae*

1.1. Position taxonomique. :

régne	Bactéria
Embranchement	Protéobactéria
Classe	Gamma Proteobacteria
Ordre	Enterobacteriales
Famille	Enterobacteriaceae
Genre	Klebsiella
Espèce :	<i>Klebsiella pneumoniae</i>

Tableau 01 : Classification de *Klebsiella pneumoniae* selon Bergey (11)

1.2. Caractères bactériologique :

1.2.1. Caractères morphologiques

Sont des bacilles a gram négatif, anaérobies facultatifs , immobiles ,groupés en diplobacilles ou en court chaînettes ,, non sporulées, généralement capsulée (1)

1.2.2. Caractères cultureux :

Klebsiella pneumoniae est un anaérobie facultatif mésophile, capable de se développer dans une large gamme de température et se développe le mieux à 37°C . se développe facilement sur les milieux ordinaires couramment utilisés pour isoler les entérobactéries, par exemple la gélose nutritive , et sur des milieux d'ensemencement plus différentiels pour les entérobactéries, comme la gélose de MacConkey.(2)

1.2.3. Caractères biochimiques :

K. pneumoniae présente les caractères généraux des entérobactéries c'est une bactérie aéro-anaérobie facultative, fermentant le glucose avec production de gaz, oxydase négative, catalase positive (3).

1.3. Pouvoir pathogène :

K. pneumoniae est actuellement considéré comme l'un des agents pathogènes opportunistes les plus importants causant des infections nosocomiales et communautaires, en particulier chez les personnes immunodéprimées, avec des taux accrus en milieu hospitalier liés à l'utilisation d'agents antimicrobiens. Le tractus gastro-intestinal sert de réservoir et est souvent la source latente d'infections (4), Parmi les infections communautaires, *K. pneumoniae* est responsable d'infections bronchopulmonaires incluant les pneumonies lobaires nécrosantes, les abcès pulmonaires, les pleurésies purulentes (5) . et aussi responsable d'infections intra-abdominales ,urinaires, sanguines et des plaies et récemment, un syndrome d'abcès du foie apparu a été largement rapporté dans les pays asiatiques (6).

La pathogénicité de *K. pneumoniae* est due à divers facteurs de virulence qui lui permettent de surmonter l'immunité innée de l'hôte et de maintenir l'infection chez un hôte mammifère. Ces facteurs comprennent la capsule et l'hypermucoviscosité, les lipopolysaccharides, les adhésines, les systèmes d'acquisition du fer, la résistance sérique et la formation de biofilm (7).

2. Généralités sur *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa s'est imposé comme un pathogène opportuniste , hospitalier très important du fait du nombre et de la gravité des infections causées ,est une bactérie à Gram négatif appartenant à la famille des Pseudomonadaceae(8) .Elle présente une résistance naturelle à de nombreux antibiotiques ,*P. aeruginosa* est une espèce remarquable par sa capacité à acquérir des mécanismes de résistance aux antibiotiques(9).

2.1. Position taxonomique :

Pseudomonas aeruginosa est classée d'après Bergey comme suit :

Régne	Bacteria
Embranchement	Protéobactéria
Classe	Gammaproteobacteria
Orde	Pseudomonadales
Famille	Pseudomonadaceae
Genre	<i>Pseudomonas</i>
Espèce	<i>Aeruginosa</i>

Tableau 02 : Classification de *Pseudomonas aeruginosa* selon Bergey (11)

2.2. Caractères bactériologique :

2.2.1. Caractères morphologiques :

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie à Gram négatif ubiquitaire, non sporulant, bacille fin sous forme de bâtonnet de 1 à 3µm de long ; 0,5 à 1µm de large., il est très mobile grâce à une ciliature polaire en général monotriche(10).

2.2.2. Caractères cultureux :

Est une bactérie qui vit normalement à l'état de saprophyte dans l'eau et le sol humide ou sur les végétaux. Cette bactérie peut vivre en commensale dans le tube digestif de l'Homme et de divers animaux, Elle peut croître entre 5 et 42°C avec un optimum de 30 °C. Par contre, elle supporte de moindres variations de pH (6,5 à 7,5) avec un pH optimal de 7,2. Culture facile sur milieu nutritif simple (13).

2.2.3. Caractères biochimiques :

Pseudomonas aeruginosa appartient au groupe des non fermentants. Bactérie aérobie stricte, mobile, produisant de la pyocyanine, réduction des nitrates en nitrites + ,oxydase +(6).(12).

il est facilement distinctive grâce à la production de la pyocyanine, un pigment bleu-vert diffusible dans le milieu extracellulaire, d'où le nom de bacille pyocyanique(15).

Selon BARIR et d'après DELARRAS le *P.aeruginosa* produit deux types de, ils peuvent être mis en évidence dans les milieux de King B et King A. **Pyoverdine** : pigment jaune-vert fluorescent,. **Pyocyanine** : pigment bleu-vert non fluorescent (14).

2.3. Pouvoir pathogène :

Pseudomonas aeruginosa s'est imposé comme un pathogène opportuniste , hospitalier très important du fait du nombre et de la gravité des infections causées (14) .Elle présente une résistance naturelle à de nombreux antibiotiques ,*P. aeruginosa* est une espèce remarquable par sa capacité à acquérir des mécanismes de résistance aux antibiotiques(17).

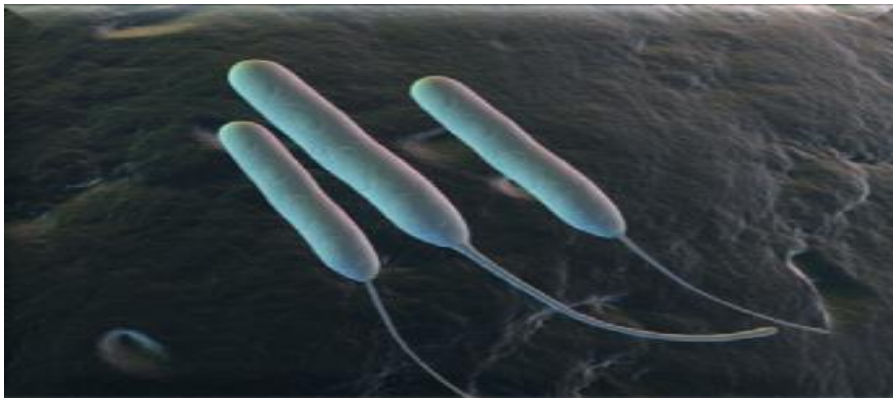


Figure 01: Ciliature monotriche de *P. aeruginosa* (15)

3. Les antibiotiques :

3.1. Définition :

Les antibiotiques se définissent comme des molécules capables d'inhiber la croissance ou même de tuer des bactéries, sans affecter l'hôte (cellules eucaryotes). Les sources principales d'antibiotiques sont les champignons, mais parfois aussi les bactéries.

Au départ de molécules naturelles, cependant, des modifications chimiques sont souvent apportées pour améliorer l'activité et/ou modifier des paramètres pharmacocinétiques essentiels. Aujourd'hui, la plupart des antibiotiques en usage clinique sont donc obtenus par semi-synthèse(16).

3.2. Classification :

Il existe plusieurs familles d'antibiotiques. Les principales sont les bêta-lactamines (pénicillines et céphalosporines), les macrolides, les aminosides, les cyclines et les quinolones.(17)

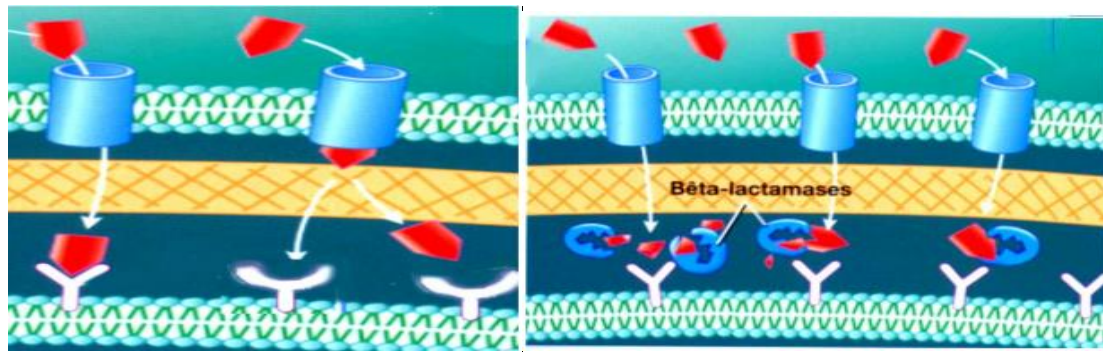
Ces grandes familles d'antibiotiques se différencient par :

- leur spectre d'activité
- leurs indications
- leur voie d'utilisation
- leur mode d'emploi et leur fréquence d'utilisation
- leurs contre-indications
- leurs effets indésirables

- **LES BÊTA-LACTAMINES :**

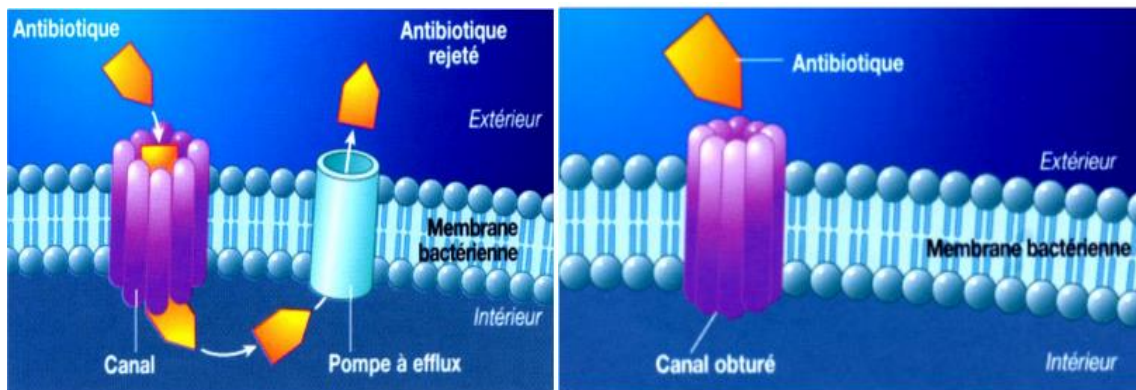
Les β -lactamines constituent une famille majeure d'antibiotiques très largement utilisés en clinique.

Mode d'action : Ces molécules agissent en inhibant la synthèse de la paroi bactérienne par fixation aux protéines liant les pénicillines (PLP), enzymes impliquées dans la synthèse du peptidoglycane. Chez les bacilles à Gram négatif (BGN), il existe 3 types de mécanismes de résistance aux β -lactamines : la faible affinité pour les PLP(1), , l'inactivation enzymatique par les β -lactamases(2) et les phénomènes d'imperméabilité et d'efflux(3) .(18) (Figuer34)



(1)

(2)



(3)

Figure 02 : les différents types de mécanismes de résistance aux β -lactamines (1) : Modification du site des PBP liant les antibiotiques Bêta –Lactame(2) : Inactivation enzymatique par les Bêta-Lactamases(3) : les phénomènes d'imperméabilité et d'efflux (34)

- **Les AMINOSIDE:**

les antibiotiques sont actifs sur les bactéries gram positif, notamment les staphylocoques. Ils ne passent pratiquement pas à travers la paroi de l'intestin et sont donc administrés par voie injectable. Ils sont indiqués dans le traitement de diverses maladies infectieuses, notamment urinaires et rénales car ils sont éliminés sous forme active par les reins.(17)

Mode d'action : Diminution de la perméabilité de la paroi bactérienne par lequel l'antibiotique entre dans la bactérie.(20)

- **Les MACROLIDES :**

Ces antibiotiques sont actifs sur certaines bactéries gram positif. Ils sont indiqués dans les infections du nez, de la gorge et des oreilles (notamment lorsque les pénicillines ne peuvent pas être utilisées), ainsi que des infections des bronches et des poumons, de la peau, des organes génitaux et de la bouche.(17)

Mode d'action : Arrête la prolifération bactérienne en se liant au ribosome bactérien et en inhibant la synthèse des protéines.(20)

- **Les FLUOROQUINOLONES :**

Disponibles depuis plus de 30 ans, les fluoroquinolones sont des **antibiotiques puissants et très largement utilisés**. En 2019, la mise en évidence d'un risque d'effets indésirables très rares, mais graves.(19)

Mode d'action : Détruit la bactérie en inhibant la synthèse du DNA bactérien en détruisant l'activité de la DNAGyrase bactérienne : Mutation au niveau du récepteur de la DNAGyrase bactérienne ; Efflux = l'antibiotique est « pompé » hors de la bactérie dès qu'il y entre.(20)

- **Les CYCLINES :**

Les cyclines sont des antibiotiques qui inhibent la synthèse des protéines des bactéries. Elles sont actives sur différents germes, notamment les chlamydiae et les mycoplasmes, des bactéries particulières qui ne se multiplient qu'à l'intérieur des cellules.(17)

Mode d'action ;Arrête la prolifération bactérienne en se liant au ribosome bactérien et en inhibant la synthèse des protéines.(20)

3.3. La famille des β - laclamines :

3.3.1. Définition :

Les β -lactamines sont une grande famille d'antibiotiques utilisés dans le traitement de plusieurs infections à Gram positif et à Gram négatif(20). Ces molécules agissent en inhibant la synthèse de la paroi bactérienne par fixation aux protéines liant les pénicillines (PLP), enzymes impliquées dans la synthèse du peptidoglycane.(18)

3.3.2. Structure et classification :

Leurs structures ont en commun un cycle β -lactame nitré à 4 sommets qui constitue la fonction chimique indispensable à l'activité antibactérienne de la β -lactamine(20). Les β -lactamines comprennent 5 sous-classes : les pénicillines, les carbapénèmes, les céphalosporines et les monobactames, ainsi que les inhibiteurs des β -lactamases discutés plus loin et qui n'ont pas d'activité antibactérienne intrinsèque.

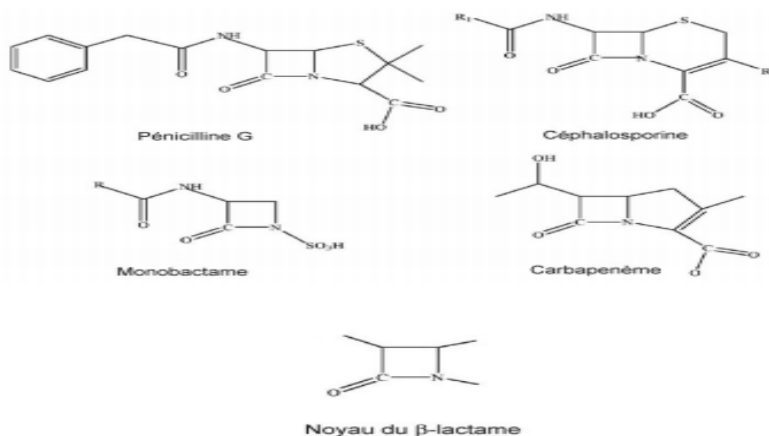


Figure 03 : Cycle d'un anneau β -lactame et les structures du noyau de base des β -lactamines (21)

3.3.2.1. Les pénicillines :

sont classées en fonction des différents substituants fixés à l'acide 6-aminopénicillanique, ce qui détermine des propriétés pharmacologiques et antibactériennes différentes(22). Il peut être substitué par acylation sur sa fonction aminée pour donner naissance à des dérivés qui se distinguent par la stabilité, la pharmacocinétique, le spectre et la résistance aux β -lactamases.(23)

3.3.2.2. Les carbapénèmes :

Les Carbapénèmes sont des antibiotiques appartenant à la famille des β -lactamines possédant un très large spectre d'activité, leur permettant d'avoir une action sur les bactéries multirésistantes telles que les EBLSE. Structuralement, ils se distinguent des pénicillines par la présence d'un atome de carbone en position 1 au lieu d'un atome de soufre (26).

ils font partie des antibiotiques utilisés en première ligne au cours du traitement probabiliste des infections nosocomiales sévères(24)

3.3.2.3. Les céphalosporines :

Ce sont des antibiotiques proches des pénicillines (elles ont un mécanisme d'action semblable,). Par rapport à l'acide 6-aminopénicillanique, ce noyau possède un carbone supplémentaire, mais la distance séparant la fonction carboxylique de l'amide cyclique reste conservée. Elles sont divisées en trois groupes dits de 1ère, 2ème ou 3ème génération.(23)

Les céphalosporines sont, comme les autres β -lactamines, des inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycane. (25)

3.3.2.4. Les monobactames :

Les monobactames sont des β -lactames monocycliques, initialement découvertes dans des surnageants de culture de bactéries plutôt que de levures comme dans le cas des autres β -lactames.(23)

3.3.3. Mode d'action des β -lactamines :

Pénétration dans la bactérie : Les β -lactames ne doivent pas pénétrer à proprement parler dans la bactérie, mais bien rejoindre leur cible au niveau de la face interne de la paroi (espace périplasmique). Cet accès est direct pour les Gram (+). Par contre, les β -lactames doivent emprunter les passages ménagés par les porines au niveau de la membrane externe des Gram (-) pour rejoindre l'espace périplasmique.

Activité antibactérienne : Les antibiotiques de type β -lactames sont des inhibiteurs de la synthèse de la paroi bactérienne. L'ensemble des perturbations de la formation de la paroi bactérienne explique l'arrêt de croissance de ces bactéries. L'effet bactéricide serait obtenu indirectement par activation d'enzymes lytiques, par sensibilité à l'hypotonie, ou par d'autres effets encore mal compris.(23)

3.4. Mécanismes de résistance par Beta lactamase :

3.4.1. Bêta-lactamases :

Les B-lactamases, produites par les bactéries, sont des enzymes qui causent la résistance aux antibiotiques de β -lactamines en hydrolysant leurs cycles β -lactames. Les B lactamases constituent toujours le principal mécanisme de résistance naturelle et acquise aux B lactamines.

Les noms des B-lactamases dérivent des substrats préférés (ex: CTX; Céfotaximase), des propriétés biochimiques (ex : SHV; Sulfhydryl reagent variable), de la souche bactérienne (ex: AER; Aeromonas), du patient donneur d'échantillon (ex: TEM; Temoneira) selon les auteurs (ex : PIT; Pitton)...etc (27).

3.4.2. Classification :

Parmi les nombreuses classifications proposées, les plus utilisées sont la classification structurale d'après Ambler et la classification fonctionnelle par groupe en fonction des spectres de substrats et d'inhibition .

3.4.2.1. La classification de Ambler dite structurale :

C'est une classification moléculaire basée sur l'homologie des séquences peptidiques des β -lactamases. Elle est divisée en 4 classes : A, B, C et D. Les classes A, C et D possèdent un résidu sérine au niveau de leur site actif alors que la classe B est une métallo- β -lactamase qui a un ion zinc dans le site actif.

3.4.2.2. La classification de Bush dite fonctionnelle :

La classification biochimique la plus complète et la plus récente est celle de Bush et coll. (1995). Elle divise les β -lactamases en 4 groupes en se basant sur le profil hydrolytique (profils du substrat et de l'inhibiteur) d'une part et la structure primaire en acides aminés d'autre part . C'est une réorganisation des classes proposées par Ambler.(29)

Ambler classification system		
class A	penicillinases	TEMs, SHVs, PC1, CTX-Ms, SME-1, KPC-1
class B	metallo-beta-lactamases (zinc)	IMP-1, VIM-1, Ccr A
class C	cephalosporinases	AmpCs, CMY-2, ACT-1
class D	oxacillinases	OXA-1
Bush-Jacoby-Medeiros classification		
Group 1	cephalosporinases	AmpCs, CMY-2, ACT-1, MIR-1
Group 2	hydrolyze extended-spectrum cephalosporins; clavulanate resistant	
2a	all clavulanic acid susceptible	
2b	penicillinase	PC1 from <i>S. aureus</i>
2b	broad-spectrum penicillinase	TEM-1, SHV-1, TEM-2
2be	ESBLs	SHV-2, TEM-10, CTX-Ms
2br	inhibitor resistant	TEMs, IRTs TEM-30, TEM-31
2c	carbapenem hydrolyzing	PSE-1
2d	oxacillin hydrolyzing	OXA-10, OXA-1
2e	cephalosporinases inhibited by clavulanate	FEC-1
2f	carbapenemases	KPC-1, SME-1
Group 3	metallo-beta-lactamases	IMP-1, VIM-1, Ccr A
Group 4	hydrolyze imipenem, inhibited by EDTA, resistant to clavulanate	
	miscellaneous	

Tableau 03: classification des bêta-lactamases d'Ambler et Bush-Jacoby-Medeiros(28)

3.4.3. Structure des Bêta-Lactamases :

Ces enzymes présentent un grand degré de diversité avec un profil catalytique semblable. Les Bêta-Lactamases appartenant aux classes A, C et D présentent un grand degré d'homologie structurale et descendent de ce fait d'un ancêtre commun et sont regroupées dans les Bêta-Lactamases à Sérine active alors que celles appartenant à la classe B sont regroupées à part dans la classe des MBL(Métallo-Bêta-Lactamase) car elles ont un ion métallique de Zinc dans leur site actif qui participe dans la lyse du cycle Bêta-lactame . Pour une classe donnée, le site actif contient quelques chaînes peptidiques qui diffèrent d'un type à un autre au sein de cette classe (35).

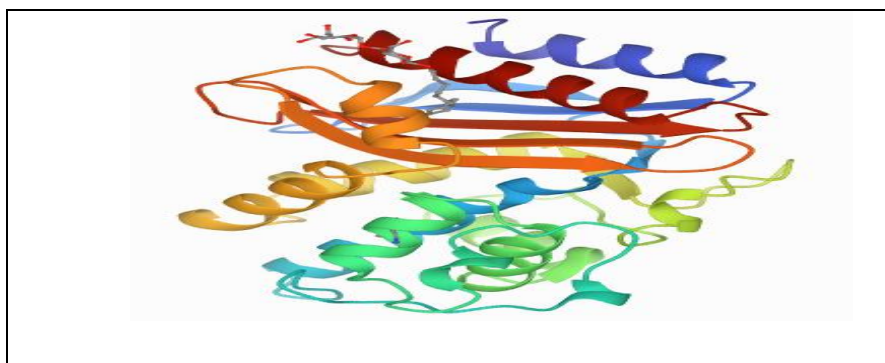


Figure 04: La structure cristallographique aux rayons X de la bêta-lactamase SHV-1 pdb (83)

3.4.4. Les β -lactamases à spectre étendu (BLSE) :

3.4.4.1. Définition des BLSE :

Les BLSE sont définies comme des enzymes appartenant à la classe A ou D de la classification d'Ambler, capables d'hydrolyser les pénicillines, céphalosporines (C1G, C2G, C3G et C4G) .Ce terme désigne les β -lactamases responsables de la résistance aux β -lactamines à large spectre, habituellement actives contre les bacilles Gram. Ces enzymes dérivent, par mutation, de pénicillinases (TEM, SHV) d'origine plasmidique. Elles sont produites, généralement, par de nombreuses Entérobactéries .Dans la classification de Bush, les BLSE sont regroupées dans deux sous-groupes du groupe 2, le sous-groupe 2be (BLSE de classe A) et 2d (BLSE de classe D). (27)

3.4.4.2.Types des BLSE :

La plupart des BLSE sont des dérivés des enzymes de TEM ou de SHV, pour les deux groupes d'enzymes, quelques mutations dans leur gène provoquent l'augmentation de leur spectre d'activité. Toutefois, toutes ces BLSE ont la particularité d'être inhibées par l'acide clavulanique..(29)

/	Différents types de BLSE
Anciennes BLSE	TEM (Temoneira - nom du patient)
	SHV (Sulphydryl variable)
Nouvelles BLSE	CTX-M (Céfotaximase-Munich)
	PER (Pseudomonas extended resistance)
	VEB (Vietnam Extended-spectrum Beta-lactamase)
	GES (Guyana Extended-Spectrum Beta-lactamase)
	OXA (Oxacillinase)

Tableau 04: quelques types de BLSE

4. Résistance de *Klebsiella pneumoniae* aux b-lactamine :

4.1.Types de résistance

4.1.1 résistance naturelle :

K. pneumoniae est naturellement résistant aux pénicillines (amoxicilline, ticarcilline) par production d'une pénicillinase chromosomique (avec plusieurs variants SHV, LEN, OKP). Cette enzymes est sensible à l'action des inhibiteurs (acide clavulanique, tazobactam), Ainsi, le phénotype sauvage de *K. pneumoniae* est sensible aux associations amoxicilline (ou ticarcilline) + acide clavulanique et pipéracilline + tazobactam ainsi qu'à l'ensemble des céphalosporines. Elle est également sensible aux céfamycines, à l'aztréonam et aux carbapénèmes (30,31).

4.1.2. Résistance acquise :

Chez *K. pneumoniae*, la résistance acquise aux céphalosporines de troisième génération (C3G), telle la ceftazidime, est décrite depuis 1985 et elle peut être liée à la production de β -lactamases à spectre élargi ou étendu (BLSE) qui sont sensibles aux inhibiteurs de β -lactamases (enzymes de la classe A)(10). Il y a un grand diversité des beta-lactamases à spectre étendu décrites dans *Klebsiella pneumoniae*, telles que TEM-3, TEM-10 (ou MGH-1), TEM-12 (ou YOU-2), TEM-24, TEM-26 (ou YOU-1). De nombreux variants de type SHV sont également connus (SHV-4, SHV-5, SHV-6 ou SHV-8). Plus récemment, la BLSE TEM-52 a été caractérisée : elle présente une activité inhabituelle vis-à-vis du moxalactame. Et aussi décrite une résistance au céfépime et au ceftiprome :est semble liée à la combinaison de deux mécanismes : la production à haut niveau d'une BLSE SHV-5 et une diminution de la perméabilité de la membrane externe.(30)

5. Résistance de *P. aeruginosa* aux beta lactamine :

5.1. Types de résistance :

5.1.1. Résistance naturelle :

Pseudomonas est naturellement résistant à un grand nombre d'antibiotiques en raison de la production d'une beta-lactamase chromosomique inductible de classe C qui n'est pas inhibée par le clavulanate et qui hydrolyse préférentiellement les céphalosporines

de première génération(32), d'une mauvaise perméabilité membranaire(33) et d'un système d'efflux membranaire, capable d'exporter les antibiotiques en dehors de la cellule. Cette pompe à efflux est composée de trois protéines incorporées dans les membranes internes et externes de la paroi bactérienne (34).

5.1.2. Résistance acquis :

La résistance aux bêta-lactamines chez *Pseudomonas* pose souvent de sérieux problèmes car elle entraîne souvent la résistance à la plupart des antibiotiques. Ce type de résistance est généralement lié à des mutations conduisant à une hyperexpression de la bêta-lactamase chromosomique de classe C et à une diminution de la perméabilité membranaire (déficit de la porine D2 spécifiquement associée à la résistance à l'imipénème) .(35)

De nombreuses bêta-lactamases (Types TEM, OXA, PSE), conférant la résistance aux pénicillines, ont été identifiées chez *P. aeruginosa*.

5.2. Mécanismes de résistance par Bêta lactamase à spectre étendu (BLSE) :

Cette bactérie ubiquitaire dans l'environnement produit naturellement une céphalosporinase (AmpC), synthétisée à un niveau relativement faible mais qui participe à la résistance naturelle importante de cette espèce, et exprime naturellement plusieurs systèmes d'efflux dont le plus important est MexAB-OprM . Elle développe par ailleurs une résistance acquise très fréquente et en constante évolution. Celle-ci est liée à sa capacité d'acquérir divers mécanismes de résistance, enzymatiques (pénicillinases, hyperproduction de céphalosporinase chromosomique, bêta-lactamases à spectre étendu, carbapénémases de classe B) ou non enzymatiques (imperméabilité par mutation chromosomique de la porine OprD2, surexpression de systèmes d'efflux actif).(36)

6. inhibition des β- lactamases par les plantes médicinales :

Des études montrent que les plantes médicinales pourraient être des sources de composés qui peuvent être utilisés pour lutter contre les bactéries résistantes aux bêta-lactamines .

6.1. La plante *Artemisia campestris* :

6.1.1. Systématique de la plante :

Régne :plantae
Sous-règne :trachéopytes
Subdivision : spermatophytes
Classe : dicotylédones
Ordre : Asterales
Famille :Asteraceae
Genre : ArtemisiaL.
Espèce : <i>Artemisia campestris</i> L

Classification de *Artemisia herba-alba* (40)(41)



Figure 05: *Artemisia campestris* (72)

6.1.2.Nomenclature de la plante :

Noms vernaculaires : Deghoufet.

En Français : Armoise rouge

En Arabe : دققت

Nom scientifique : *Artemisia campestris* (72)

6.1.3.Description botanique :

Artemisia campestris est une plante aromatique à tiges robustes d'une hauteur de 30 à 80cm. Cette plante possède des capitules très petits, étroits (1 à 1,5 mm) ovoïdes ou coniques, à involucre scarieux, ne contient que 3 à 8 fleurs de couleur jaunâtre bordées de rouge, et à pédoncule muni de poils blanchâtres à brunâtre, Les feuilles d'*Artemisia campestris* sont glabres de couleur verte foncée, les inférieures dipinnatiséquées, les

supérieures pinnatiséquées, les basales pétiolées et auriculées, les tiges sont ligneuses à la base striée (38,39).

6.1.4. Distribution géographique d'*Artemisia campestris* :

Artemisia campestris L. pousse dans des habitats ouverts tels que les prairies, les forêts de pins, les espaces ouverts et les sommets des montagnes, principalement sur des sols secs, et est généralement une espèce sauvage.

cette plante est largement distribuée en Amérique du Nord, en Russie Européenne, en Europe (42). En Europe central et en Europe du sud Cette plante pousse sur des sols herbeux riches en éléments alcalins ; elle est considérée comme un type basique de terre perturbée, sillonnée de rivières asséchées dans le sud de l'Espagne (43).

Elle prédomine dans les régions arides des pays de l'Afrique du Nord (44). Surtout dans les pays méditerranéens, il préfère les habitats semi-arides et offre une bonne couverture du sol. En plus de ses propriétés de protection de surface, il est également une source de débris (45).

6.1.5. Composition chimique :

Cette plante s'est avérée riche en flavonoïdes, en acides phénoliques et en composés terpéniques.

6.1.5.1. Flavonoïdes :

Les flavonoïdes sont des polyphénols complexes dont la structure est constituée de noyaux aromatiques et d'un hétérocycle oxygéné. (40)

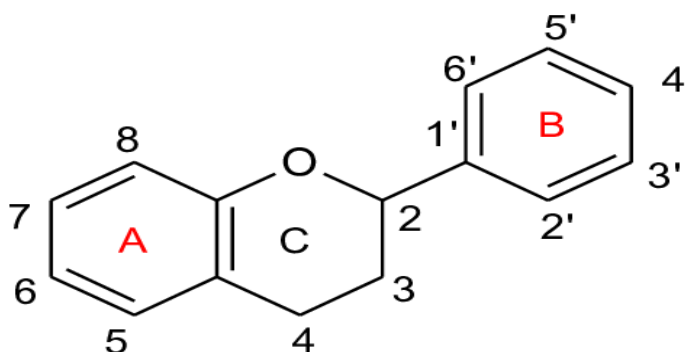


Figure 06 : structure chimique de base des Flavonoïdes (95)

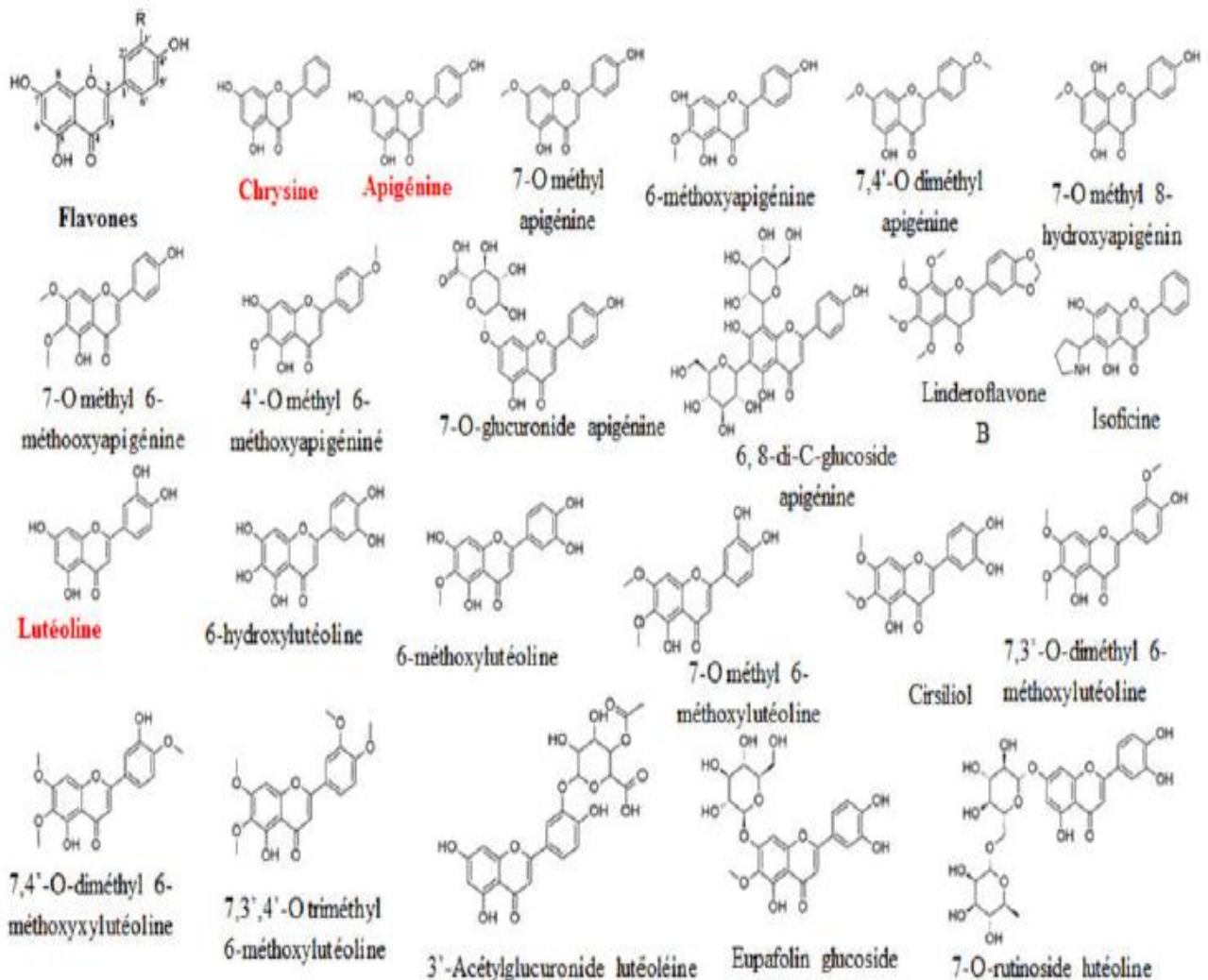
Il devise en deux sous classe :

- **flavones** :comme

l'apigénine ; 7-O-glucuronide apigénine ; 6- methoxyapigénine (hispiduline) ;

7-O-méthyl 6-methoxyapigénine (cirsimaritrine) ; 4'-O-méthyl 6-methoxyapigénine ; 7-O-hexoside apigénine ; 7-O-méthyl 8-hydroxyapigénine ; 6,8-di-C-glucoside apigénine ; 6-C-glucuronide apigénine ; 8-C-pentoside apigénine 7,4'-Odiméthyl Apigénine .

la lutéoline ; 7-O-méthyl 6- methoxylutéoline (cirsilinol) ; 7,3'-O-diméthyl 6-methoxylutéoline (cirsilinol) ; 6- methoxylutéoline (eupafolin) ; 7,3',4'-O-triméthyl 6-methoxylutéoline acétyl-glycuronide ; 7,4'-O-diméthyl 6-methoxylutéoline (eupatorin) ;



6-methoxylutéoline glycoside (eupafolin glycoside) ; 7 -O- rutinoside lutéoline. la chrysin .

figure 07 : Structures chimiques des flavones identifiés dans *A.campestris* L (41)

- **flavonols** : inclus les molécules suivants :

kaempférol et ses dérivés : 3,7,4'-O-triméthyl 6-methoxykaempférol ; 7-O-méthyle kaempférol ; 3,7-O-diméthyle kaempférol ; 3-rhamnoside kaempférol ; 3-rutinoside kaempférol ; 1 3,7,4'-O-triméthyl kaempférol .

la quercétine et ses dérivés : 7-O-méthyl quercétine (rhamnétine) ; 3,3'-O-diméthyl quercétine ; 6-hydroxyquercétine (quercétagétine), 3'-O-méthyl quercétine (isorhamnétine) ; 4'-O-méthyl quercétine (tamarixetin) ; 3-O- glucuronide quercétine ; 3-rutinoside quercétine (rutine) ; 3-galactoside quercétine (hypéroside) ; 3'-O-méthyle hexoside quercétine ; 3-O-méthyl 6-methoxyquercétine (axillarine).(40)

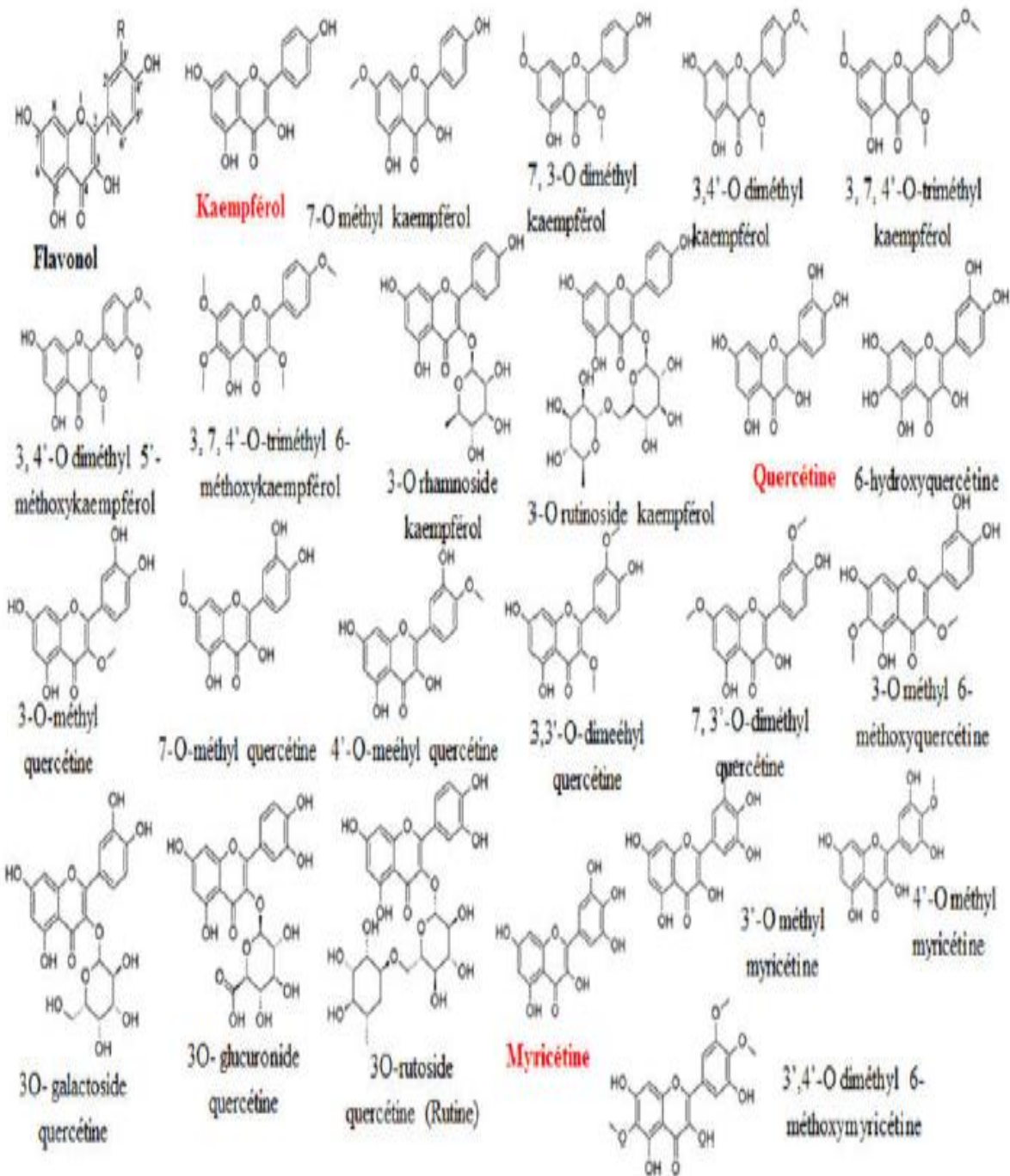


Figure 08 : Structures chimiques des flavonols identifiés dans *A.campestris* L.(41)

6.1.5.2. acides phénoliques :

les principaux acide phénolique trouver dans l'*Artemisia campestris* est l'acide 4-méthoxy cinnamique, l'acide p-coumarique, l'acide férulique, et l'acide chlorogénique , l'acide vanillique, les acides isochlorogéniques A,B et C nouveau acides phénoliques ont été identifiées ,il s'agit de l'acide néochlorogénique, l'acide 4-Ocafféoylquinique en plus de l'acide chlorogénique(40,61).

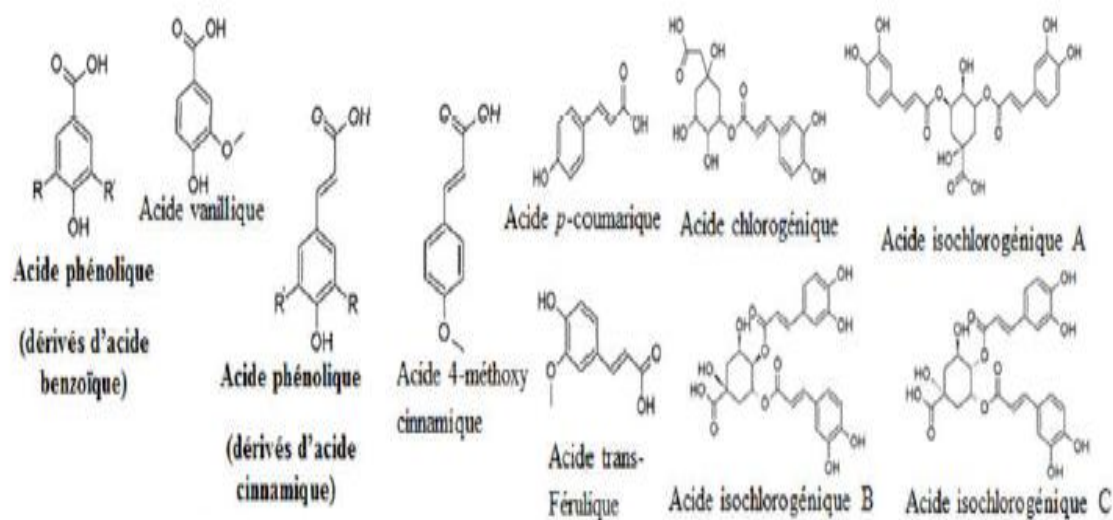


Figure 09: structure chimique d'acide phénolique et ses dérivé (41)

6.1.5.3. Coumarines et isocoumarines :

Dans d'*artemisia campestris* trouver aésculéline, hydroxycoumarine, scopolin, et fraxidine (40). et des isocoumarines tels : Eartémidine et (+) epoxyartémidine , artémidinal(56).

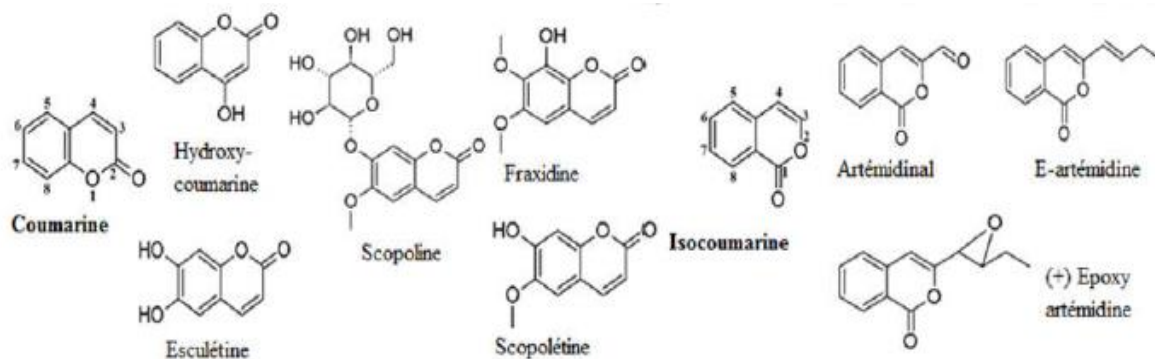


Figure 10 : structure chimique des coumarines, isocoumarines (41)

6.1.5.4. Terpène :

Les terpènes sont des molécules à base d'hydrocarbures qui possèdent une structure pouvant être hypothétiquement dérivée de l'isoprène donnant naissance à des structures qui peuvent être divisées en unités d'isopentane(41).

inclus monoterpenes α -pinène, β -myrcène, β -pinène, 1,8- cinéole, limonène, p-cymène, α -terpinène, γ -terpinène, menthol, et les sesquiterpenes : α -copaène, β -fernèsène, cis-nerolidol, et oxyde de caryophyllène.(40)

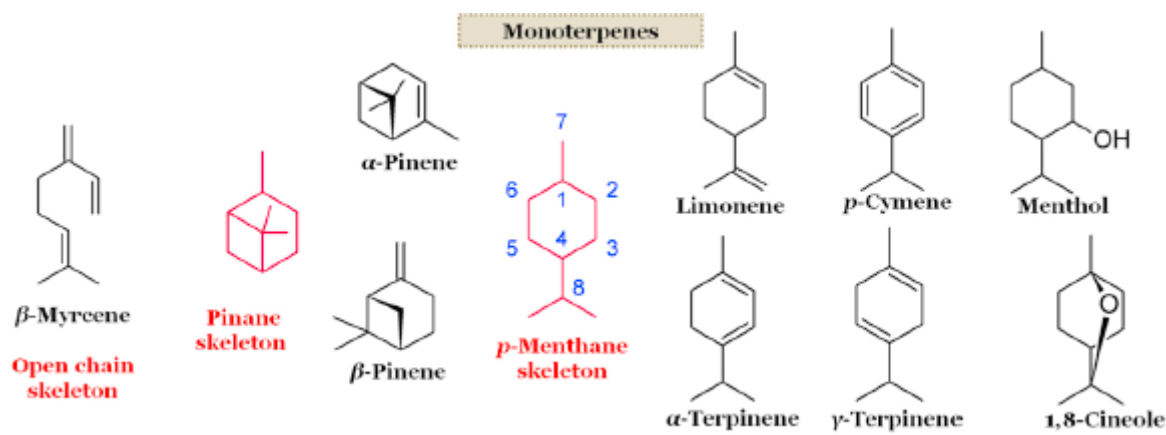


Figure 11 : structure chimique des monoerpéne (40)

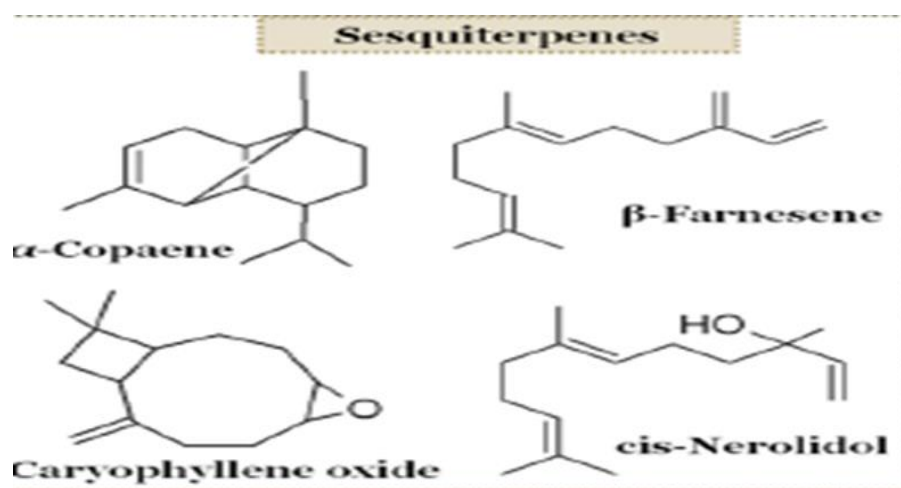


Figure 12 : structure chimique des sesquiterpene (40)

6.1.6.L'utilisation traditionnelle d'*Artemisa campestris* :

La partie aérienne de cette plante est utilisée en médecine populaire comme anthelminthique, antiseptique, cholagogue, désobstruant, emménagogue, stomachique, tonique, hypotenseur et antivenin. La plante était utilisée par certaines tribus indiennes d'Amérique du Nord comme abortif pour mettre fin aux grossesses difficiles. La plante a été écrasée et appliquée en externe sur les articulations rhumatismales, l'eczéma, les bleus et les plaies. Un cataplasme de feuilles écrasées a été appliqué sur les yeux douloureux. Une infusion des racines a été utilisée, surtout chez les enfants, comme tonique capillaire et pour traiter les infections du cuir chevelu. Elle a été prise en interne pour favoriser la miction et le transit intestinal.(46)

L'Algérie utilise cette plante pour le traitement des Affections cutanées, gastro-intestinales, analeptique, anthelminthique, et utilisé comme antidiabétique, antihypertensive, antitussive, diurétique, vulnéraire, régulateur de la circulation, fébrifuge, vermifuge, emménagogue, pour les soins post-partum, sédative, antivenin, vermifuge, contre la calvitie, pour l'amaigrissement, soin des goitre(47,48,49,50,51,52).

Et dans le maroc utilisé pour les troubles métabolique, oculaire, cutanées (mélasma), digestives, respiratoires et allergiques, Antidiabétique.(53,54,55,56).

En Tunisie utilisé comme un Antivenin, anti-inflammatoire, anti-rhum, anthelminthique, anti-eczéma, fébrifuge, antitussive, contre les infections urinaires, et pour les problèmes digestifs et cutanés, tonique(57,58,59).

6.1.7. Activité antimicrobienne :

Plusieurs études ont montré cette activité antimicrobienne contre un large spectre de souche bactérienne gram positive ou gram négative telle que *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* (60)

Une étude expérimentale menée par Tharib, et al (1983) a montré que certains composés de la partie aérienne d'*Artemisia campestris* possèdent une forte activité contre *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* et une faible activité contre *Proteus vulgaris* et aucune activité contre *Proteus pyocyanea* (69).

D'autre étude menée par Naili et al (2010) a montré que l'extrait méthanolique des feuilles d'*Artemisia campestris* possède une activité antimicrobienne contre *Escherichia coli* (avec une zone d'inhibition 10mm), *Bacillus subtilis* (zone d'inhibition 32mm), *Staphylococcus aureus* (zone d'inhibition 27mm), *Salmonella typhi* (zone d'inhibition 8mm) et *Pseudomonas aeruginosa* (zone d'inhibition 9mm). (70)

Karabegović et al. (2011) ont trouvé que deux types d'extraits méthanoliques préparés différemment à partir de la partie aérienne de la plante possèdent une activité antimicrobienne contre *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* avec des zones d'inhibition (18 à 21mm) (64).

6.2. La plante *Artemisia herba alba* :

6.2.1. Présentation de la plante :

Artemisia est le nom de genre des armoises ; *herba-alba* signifie herbe blanche. *Artemisia herba-alba* Asso. est une plante caractérisée par son arôme pénétrant, agréable et fort, tandis que le goût est extrêmement amer, la période de floraison est généralement entre mai et juin jusqu'en octobre dans certaines régions. Elle est utilisée en médecine traditionnelle pour traiter plusieurs maladies (71).



Figure 13 : *Artemisia herba- alba*(72)

6.2.2. Systématique de la plante :

Règne : Plantae.
Sous-règne : Tracheobionta.
Division : Magnoliophyta.
Classe : Magnoliopsida.
Sous-classe : Asteridae.
Ordre : Asterales
Famille : Asteraceae.
Sous-famille : Asteroideae.
Genre : Artemisia
Espèce : <i>Artemisia herba Alba</i> (Asso)

Classification de *Artemisia herba-alba* (72)

6.2.3.Nomenclature de la plante :

Noms vernaculaires : Chih.

En Français : Armoise blanche.

En Arabe : Chih, Gaisoum, Chih korassani.

Nom scientifique : *Artemisia herba Alba* Asso(72)

6.2.4. Description botanique :

L'armoise blanche est une plante des climats arides et semi-arides qui pousse dans les hautes plaines steppiques, les déserts du Moyen-Orient et de l'Afrique du Nord. (73)

C'est une plante herbacée à tiges ligneuses et ramifiées, de 30 à 50 cm, très feuillées avec une souche épaisse. Les feuilles sont petites, blanches et laineuses avec un aspect argenté. Les fleurs sont groupées en grappes, à capitules très petites et ovoïdes de 1,5 à 3 mm de diamètre.(74)

6.2.5. Distribution géographique :

Artemisia herba-alba est un arbuste nain vivace verdâtre-argenté poussant dans les climats arides et semi-arides. Il se rencontre dans la région méditerranéenne en Afrique du Nord, en Espagne, dans les déserts de la péninsule du Sinaï, au Moyen-Orient, dans l'Himalaya du Nord-Ouest et en Inde.(75)

6.2.6. Composition chimique :

Plusieurs métabolites secondaires ont été isolés et identifiés de *l'Artemisia herba alba* dont les plus importants sont les sesquiterpènes lactones et les flavonoïdes.

En plus des sesquiterpènes lactones et des flavonoïdes l'analyse phytochimique a montré que la composition des huiles essentielles de *l'Artemisia herba alba* Asso est riche en monoterpènes, triterpènes pentacycliques, santonines, coumarines et tanins. (76)

6.2.6.1. Les lactones de Sesquiterpène :

Les lactones sesquiterpéniques sont les métabolites secondaires les plus caractéristiques de nombreuses espèces du grand genre *Artemisia*.(77)

Plusieurs types de sesquiterpènes lactones ont été trouvés dans les parties aériennes de *l'Artemisia herba alba* Asso. Les Eudesmanolides suivie par germacranolides semblent les types les plus abondants dans cette espèce.

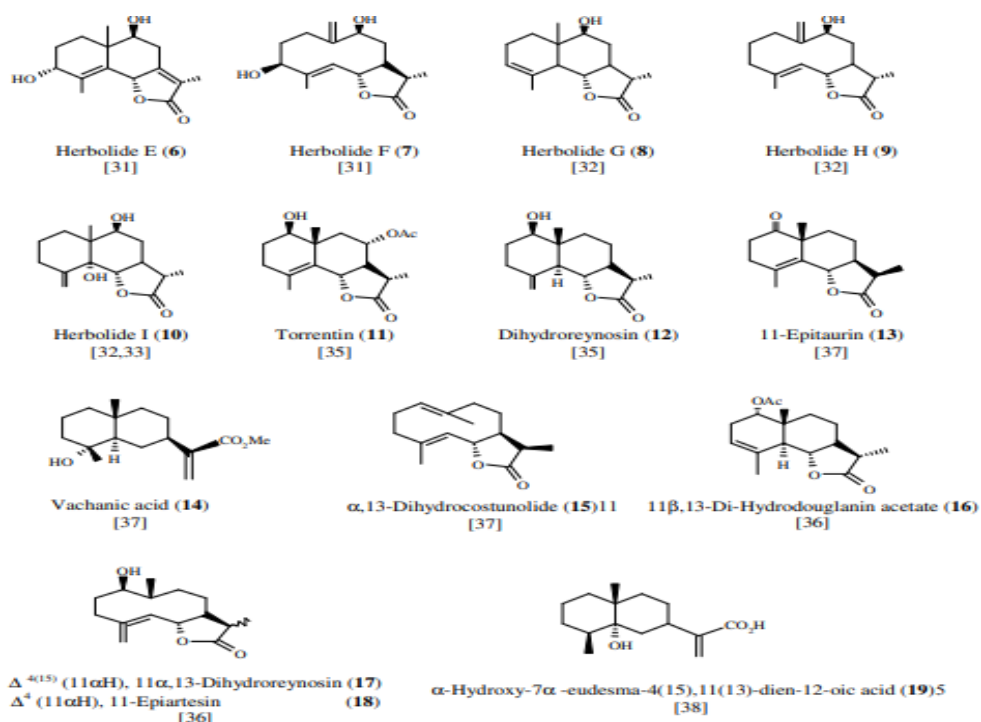


Figure 14 : Lactones sesquiterpéniques d' *Artemisia herba-alba* poussant en Algérie (78).

6.2.6.2. Les flavonoïdes :

Les flavonoïdes détectés chez *A. herba-alba* montrent une grande variation structurelle, allant de flavone et flavonol glycosides à des flavonoïdes hautement méthylés plus inhabituels. Dans les études des feuilles et les vapeurs d'*A. herba-alba* collectées au Sinaï, un total de huit flavonoïdes O- et C-glycosides ont été isolés et identifié . Examen des parties aériennes d'*A. herba-alba* collectées à partir de plantes médicinales libanaises les magasins ont conduit à l'isolement de deux flavonoïdes; hispiduline et cirsilineol . Un nouveau flavone, 5,4'- dihydroxy-6, 7,3'- triméthoxyflavone, a été isolé à partir de l'extrait non glycosidique des parties aériennes de *A.herba-alba* (78).

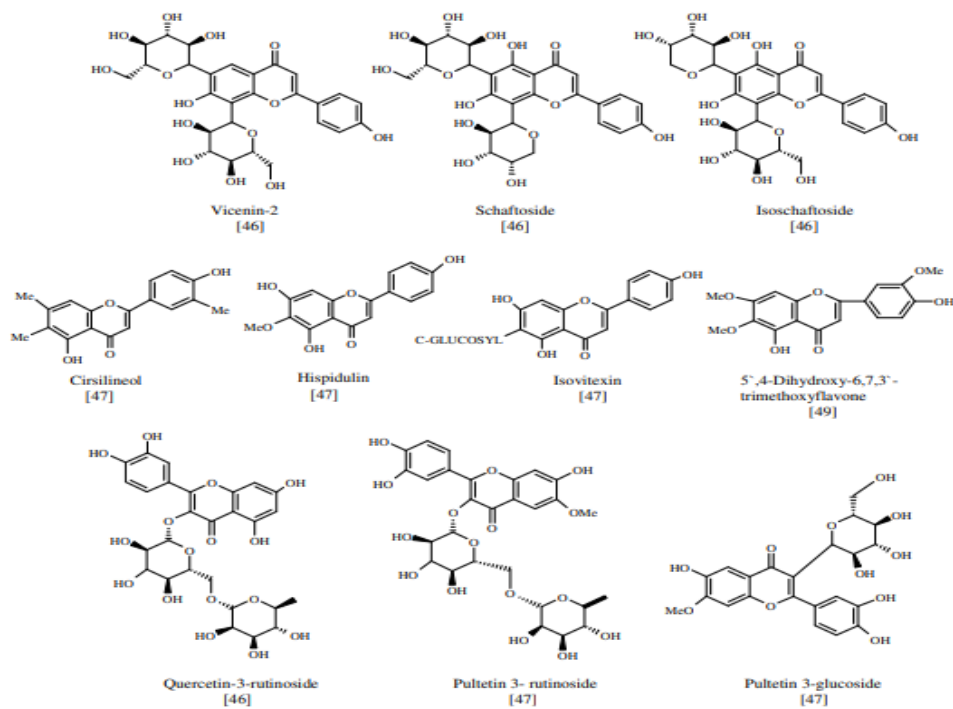


Figure 15 : les Les flavonoïdes d' *Artemisia herba-alba*.(78)

6.2.7. Utilisation thérapeutique de la plante :

L'espèce *L'Artemisia herba alba* Asso. a été utilisée en médecine traditionnelle pour traiter les rhumes, soulager le diabète, la toux, les troubles intestinaux, traiter les blessures chez l'homme diarrhées, névralgie, bronchite et l'hypertension (80).

Des recherches in vitro, ont prouvé plusieurs activités de l'extrait aqueux de l'armoise blanche, ils ont trouvé que cet extrait inhibe l'action hémolytique des venins de serpents et de scorpions ,ils ont a prouvé aussi une importante activité antioxydante de l'extrait d'*Artemisia herba alba*(79).

6.2.8. Activité antibactérienne :

Plusieurs études ont montrés que les huiles essentielles et les extraits d'*Artemisia herba alba* sont capables d'inhiber la croissance de plusieurs microorganismes, ils peuvent avoir une double action contre les microbes, elles peuvent les tuer (effet bactéricide) ou arrêter leur prolifération (effet bactériostatique). leur action se déroule en : Attaque la paroi

bactérienne, ce qui provoque une augmentation de la perméabilité , acidification de l'intérieur de la cellule provoquant la coagulation des constituants cellulaires par la dénaturation des protéines , destruction du matériel génétique qui cause la mort de la bactérie .(81)(82).

- **Synthèse des travaux effectués pour inhiber les bactéries résistantes par BLSE (entre 2007-2020):**

Une étude effectuée par Joseph GANGOUE PIEBOJI (2007) Dans le but de rechercher de nouveaux inhibiteurs des β -lactamases plus actifs, ils ont étudié deux plantes médicinales, *Garcinia lucida* (Clusiaceae) et *Bridelia micrantha* (Euphorbiaceae) en vue d'évaluer leur activité anti- β -lactamase. Les concentrations inhibant 50% de l'activité de l'enzyme (CI50) des extraits de *G. lucida* et *B. micrantha* sont respectivement de 0,01 mg/ml (β -lactamase P99) et de 0,019 mg/ml (β -lactamase OXA-10) indiquant ainsi une bonne inhibition des β -lactamases par les extraits de ces plantes. (97)

D'autre étude en 2009 a été effectuée par Joseph Gangoué et al initiée pour évaluer les propriétés antimicrobiennes de 17 extraits bruts de 12 plantes médicinales contre des bactéries résistantes aux bêta-lactamines , Les activités antimicrobiennes des extraits de plantes ont été évaluées contre des bactéries résistantes aux bêta-lactamines prouvées cliniquement (*Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus sp.*) et des souches bactériennes de référence (*Escherichia coli* ATCC 35218, *Enterobacter aerogenes* ATCC 29751, *E. aerogenes* ATCC 13048, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Enterococcus hirae* ATCC 9790) en utilisant des tests de diffusion en disque et de dilution en gélose, Parmi les 17 extraits de plantes étudiés, sept ont montré une bonne activité antimicrobienne contre les bactéries testées. L'écorce de la tige de *B. micrantha* et les feuilles de *D. pictaw* étaient les plus actives contre les bacilles Gram-négatifs producteurs de bêta-lactamase.(98).

En 2020 Stephane Efoe et al fait des études pour d'évaluer les propriétés antimicrobiennes des extraits de deux légumes feuillus *Amaranthus spinosus* et *Tridax procumbens* traditionnellement utilisés dans la région maritime du Togo pour leurs propriétés thérapeutiques. Les méthodes de diffusion en puits d'agar et de microdilution en bouillon de Mueller Hinton ont été utilisées pour estimer le potentiel antimicrobien des extraits hydroéthanoliques des légumes *Amaranthus spinosus* et *Tridax procumbens*. les extraits hydroéthanoliques des feuilles de ces plantes sur six souches de référence et neuf souches cliniques dont trois multirésistantes et productrices de bêta-lactamase à spectre étendu (BLSE). Les tests de susceptibilité antimicrobienne ont montré que ces extraits testés inhibent diversement la croissance des souches utilisées. L'extrait de *T. procumbens* était le plus actif et inhibait la croissance de toutes les souches, à l'exception de *Candida*. (99)

Docking moléculaire :

1. Introduction :

Le docking moléculaire in silico vise à prédire la structure d'un complexe moléculaire à partir des molécules isolées, ce qui est considérablement plus facile à mettre en oeuvre, moins cher et plus rapide que l'utilisation d'une des méthodes expérimentales. Les logiciels de docking sont donc des outils très utiles en biologie, pharmacie et médecine, car la plupart des principes actifs sont de petites molécules (ligand) qui interagissent avec une cible biologique d'intérêt thérapeutique, généralement protéique (récepteur), afin d'influencer le mécanisme dans lequel cette protéine est impliquée.(84) .

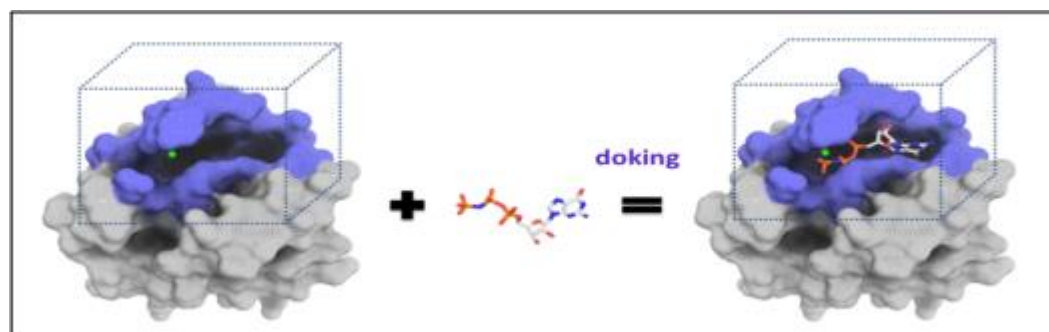


Figure 16 : Représentation schématique du docking moléculaire (96)

2. Les outils du Docking moléculaire :

Les éléments indispensables pour pratiquer un docking moléculaire se limitent en un récepteur macromoléculaire de nature protéique appelée : cible, une petite molécule appelée ligand et un programme de docking qui prédit la conformation la plus favorable du ligand au sein du récepteur choisi(85).

2.1. Les Récepteurs :

Pour l'obtention des récepteurs, on utilise les structures 3D des protéines qui sont accessibles gratuitement dans la banque de donnée PDB (Protéine Data Bank). Il s'agit d'une grande archive de données structurales de macromolécules biologiques : protéines et acides nucléiques (ADN, ARN) . Les données structurales sont obtenues par cristallographie aux rayons X, spectroscopie RMN(86).

Les différentes conformations tridimensionnelles sont téléchargeables sous extension pdb lisibles par les logiciels de docking et contenant diverses informations sur la protéine en question. Par exemple : le nom du récepteur, l'équipe qui a résolue la structure, la méthode expérimentale, ...etc(86).

2.2 Le(s) ligand(s) :

En biologie, un ligand (du latin ligandum, liant) est une molécule qui se lie de manière réversible à une macromolécule ciblée, protéine ou acide nucléique, jouant en général un rôle fonctionnel : stabilisation structurale, catalyse, modulation d'une activité enzymatique, transmission d'un signal. Ce terme, très utilisé pour l'étude de protéines, désigne les molécules qui interagissent avec la protéine de manière non-covalente et spécifique et qui jouent un rôle dans ses fonctions.

La liaison d'un ligand à une protéine réceptrice modifie souvent la conformation de cette dernière, c'est-à-dire sa structure en trois dimensions (3D). L'énergie associée aux interactions intermoléculaires formées entre la protéine et son ligand permet de promouvoir ce changement de conformation, appelé ajustement induit. Cette modification structurale peut ainsi moduler éventuellement son état fonctionnel et son activité. (87)

La structure des ligands est obtenue par deux moyens :

-Le premier : consiste à utiliser des ligands du pdb ou de la littérature qu'on peut dessiner, optimiser et enregistrer dans différents formats (pdb, mol, mol2....) grâce à des logiciels de construction moléculaires tels que Titan .

-Le deuxième : consiste à utiliser des collections de molécules (chimiothèques) virtuelles aussi bien commerciales, est constituée de bases de données de structures chimiques appelés chimiothèques ou espaces chimique les plus utilisées, « la PubChem » (88).

2.3.PubChem :

C'est une banque de données de molécules chimiques et de leurs bioactivités. Le système est maintenu par le « NCBI » (National Center for Biotechnology Information) des Etats Unis. Cette chimiothèque est consultée gratuitement via une interface utilisateur Web. Elle contient des descriptions de substances et de petites molécules avec moins de 1000 atomes et 1000 liaisons et offre des données d'ordre chimique, biochimique, pharmacologique, toxicologique...etc(89).

2.4. Drugbank :

C'est une base de données en ligne, accessible gratuitement et contenant des informations sur les médicaments et leurs cibles. Elle est largement utilisée en industrie pharmaceutique et en chimie médicale et combine les données chimiques, pharmacologiques et pharmaceutiques avec des informations complètes sur le médicament (nomenclature, description, métabolites, séquence des cibles, données sur les brevets, prix,...etc(90)(91)(92)(93).

2.5. SwissADME :

Ce serveur permet de calculer des descripteurs physicochimiques ainsi que des propriétés pharmacocinétiques des composés. .On-peut consulter ce serveur via le lien: <http://www.swissadme.ch/> (100).

2.6. PreADMET :

Est un serveur en ligne permettant de prédire les données ADMET. Dans le présent travail, ce serveur a été utilisé pour prédire plusieurs critères régissant la toxicité potentielle de nos composés. On peut consulter ce serveur via le lien : <https://preadmet.bmdrc.kr/> (101).

2.7. Programmes :

A l'heure actuelle, plus de 30 programmes de docking moléculaires (commerciaux ou non) sont disponibles .Les plus fréquemment cités sont respectivement : AutoDock, GOLD, FlexX, DOCK et ICM . Ils permettent notamment un criblage rapide de vastes bibliothèques de composés. Ces programmes reposent le plus souvent sur des algorithmes spécifiques (Algorithme génétique, Recuit Simulé...)(94).

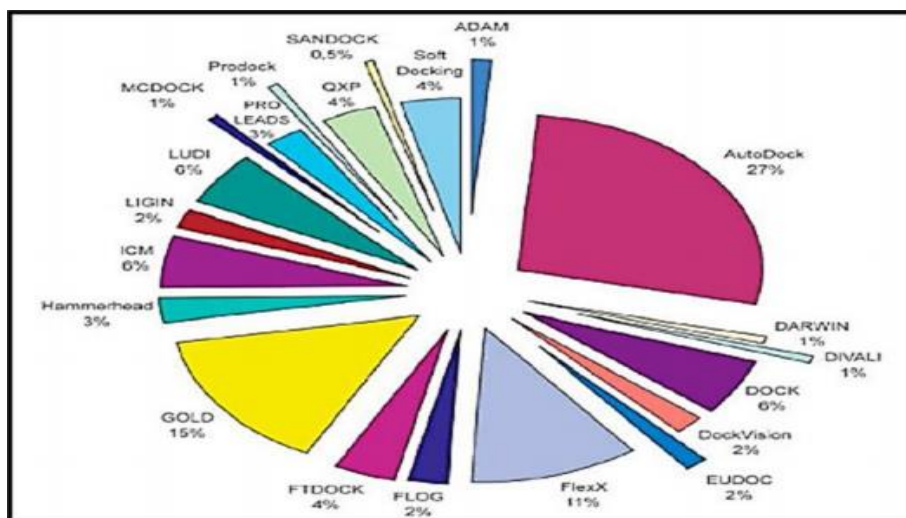


Figure 17 : Comparaison des programmes de docking les plus cités.

Nom	Editeur	Site Internet
AutoDock	Scripps	http://www.scripps.edu/mb/olson/doc/autodock/
Dock	UCSF	http://dock.compbio.ucsf.edu /
FlexX	BioSolveIT	http://dock.compbio.ucsf.edu /
Fred	OpenEyes	http://www.eyesopen.com/products/applications/fred.html
Glide	Schrödinger	http://www.schrodinger.com/Products/glide.html
Gold	CCDC	http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/life_sciences/gold/
ICM	Molsoft	http://www.molsoft.com/products.html
LigandFit	Accelrys	http://www.accelrys.com/cerius2/c2ligandfit.html
Surflex	Biopharmics	http://www.biopharmics.com/products.htm.

Tableau 05 : Principaux programmes du docking moléculaire.

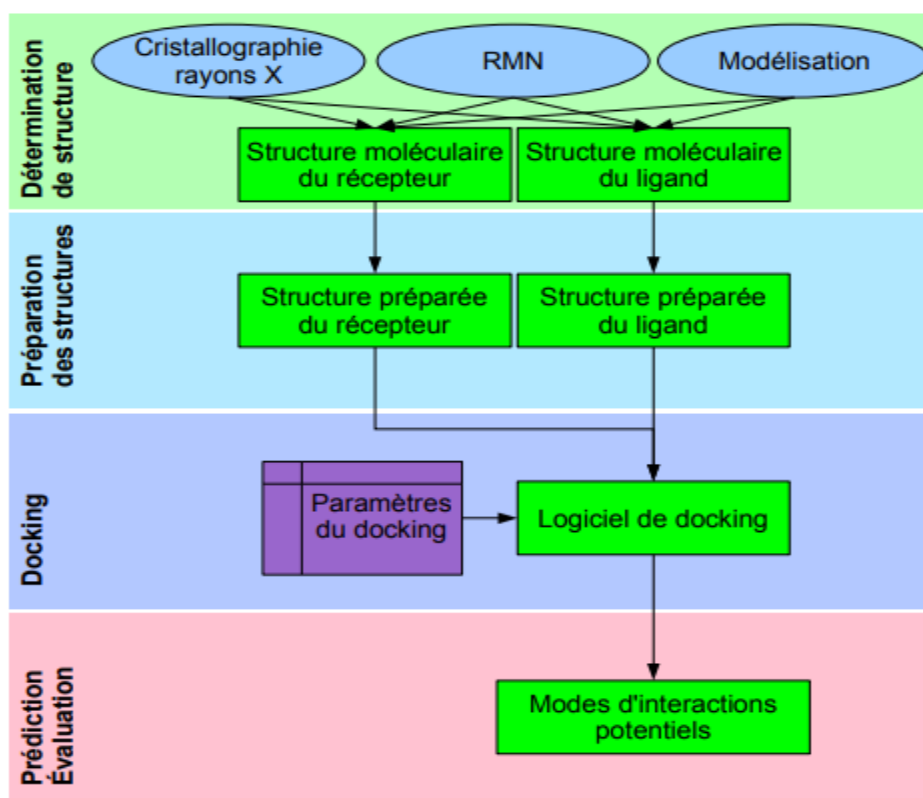


Figure 18 : Étapes typiques d'un docking

Matériels et Méthodes

Première partie : étude in vitro

1. Matériaux végétales :

Notre étude a porté sur deux espèces de plants :

- *Artemisia campestris*
- *Artemisia herba alba*

(la partie aérienne tiges ,feuilles , fleurs des 2 plantes)

2. Préparation d'extrait brut de deux plants :

Extraction par les solvants organiques :

Extraction par macération : c'est une technique qui permet d'extraire les principaux actifs. Nous avons commencé par mettre 100 ml de méthanol dans un flacon , puis ajouter 10g de matière végétale sec , Laisser macérer pendant 24h sous agitation continue à température ambiante. la solution a été centrifugée (5500rpm/15min) . Après une filtration sur papier filtrer, le filtrat est évaporés à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif "BÜCHI" à une température de 40- 50 c°. l'extrait obtenu a été dissous dans une 10 ml de méthanol(MeOH) (la conservation de l'extrait doit être au réfrigérateur 4c°) .



Figure 19 : Extraction par macération



Figure 20 : évaporation des extraits par un évaporateur rotatif

3. détermination de rendement :

Le rendement calculé selon la relation suivante :

$$R = (\text{poids de l'extrait obtenu} / \text{poids de la matière végétale totale}) \times 100$$

4. Etude de l'activité antibactériennes:

L'activité antibactérienne a été étudiée contre 7 souches bactériennes Gram + et Gram-. Ces souches nous ont été isolées et fournies par un service de bactériologie du laboratoire d'un hospital.

4.1. Les souche bactérienne testées :

Une souche de *Pseudomonas aeruginosa* (L4) , deux souches de *klebsiella pneumoniae* (S35 et F40) et une Souche de référence *Klebsiella pneumoniae* Atcc7006030 .

On a choisi ces bactérie car elles sont : responsable a des infections nosocomiales et résistants par la production de BLSE (b-lactamase a spectre élargie).

Autres souches a été isolée pour confirmer l'activité inhibitrice des extraits des plantes sélectionné sur eux : *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* , *Bacillus cereus* .

4.2. les mileux de culture utilisé :

- Mackonky .
- Milieu BHIB.
- Gélose nutritif.
- Gélose muller hinton .

4.3.Préparation des inoculum :

La revivification des bactérie fait par un ensemencement sur les milieux de culture suivants :

Solide

- Mackonky pour les souches :*Pseudomonas aeruginosa* ,*klebsiella pneumoniae* et la Souche de référence *Klebsiella pneumoniae Atcc7006030*
 - Gélose nutritif : pour *Bacillus ceureus* .
 - Chapman pour : *staphylococcus aeureus* , *micrococcus luteus* .
- Incubation à 37c° pendant 18h .

Liquide :

Nous avant fait un repiquage pour tous les souches dans un milieu liquide riche « BHIB » afin d'obtenir des cultures jeune.

- Incubation à 37° pendant 18h .

Après l'incubation, les inoculum doit être diluée par le BHIB (pour diminué la charge bactériennes) et standardiser de telle façon que sa densité optique mesuré a 620nm soit comprise entre 0.08- 0.1. La densité optique est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre .

4.4. Préparation de dilution de l'extrait d'*Artemisia campestris* :

La dilution est Pour diminué la concentration de l'extrait

- Dans un tube ont été mettre 4ml de méthanol avec 1ml de l' extrait brut de la plante .

4.5. Préparation la dilution de de l'extrait d'*Artemisia herba alba* :

Dilution 1/100 :

- Dans tube on a ajouté 900µL méthanol avec 100 µL d'extrait brut .

Dilution1/10 :

- Dans un autre tube on a ajouté 990 µL méthanol avec 10 µL extrait brut.

4.6. Technique de diffusion sur gélose (méthode de puits) :

On a coulés dans des boites de pétri le gélose Muller Hinton. L'épaisseur du milieu doit être de 4 mm car une couche plus fine augmente la taille de la zone d'inhibition ce qui peut donner un faux résultat.

On ensemence les 7 souches aseptiquement à l'aide d'une écouvillon par une suspension de 10^8 cellules /ml .

A l'aide de la partie supérieure de pipette pasteur stérile., on a créé 4 puits dans la gélose de chaque boite.

Le premier puit a été remplirai par l'extrait pure d'*Artemisia campestris*, le deuxième puits par l'extrait pure d'*Artemisia herba alba*, le troisième par l'extrait d'*Artemisia herba alba* diluée 1/100, et le dernière puits par la dilution 1/10.

- Incubation des boites a 37c°pendant 24h.

5. Etude de l'activité antibiofilm :

On va faire une activité antibiofilm pour :les deux souches de *klebsiella pneumoniae* (S35et F40) , Souche de référence *Klebsiella pneumoniae Atcc7006030* , *Pseudomonas aeruginosa* (L4).

Méthode de microdilution en microplaque 96 puits :

Dans le premier puits on a ajouté 20 ul de l'extrait méthanolique avec 280ul de suspension bactérienne testé , pour avoir un volume finale 300 ul , dans la même ligne on remplit chaque puits par 150ul de suspension bactérienne testé . aussi autre ligne utilisé comme contrôle négative. après avoir bien mélangé le contenu de le premier puits , nous avons pris 150ul et ajouter dans le puits suivants, l'opération a été répéter jusqu'à le dernier puits de même ligne , la quantité 150 ul restent doit être éliminé .

- Incubation à 37c°pendant 24h.

Après l'incubation, les cellules ont été retirées en retournant la plaque et en secouant le liquide. La microplaque est lavée à l'eau distillée. Le processus est répété deux fois, Cette étape permet d'éliminer les cellules non attachées et les composants du support qui peuvent être colorés à l'étape suivante et de réduire considérablement la coloration de fond. Puis remplisse tous les puits avec du cristal violet, Incuber la microplaque à température ambiante pendant 15 min. La plaque est rincée 3 à 4 fois à l'eau en la plongeant dans un bol d'eau, puis séchée avec du papier absorbant pour débarrasser la plaque de tout excès de cellules et de pigment.

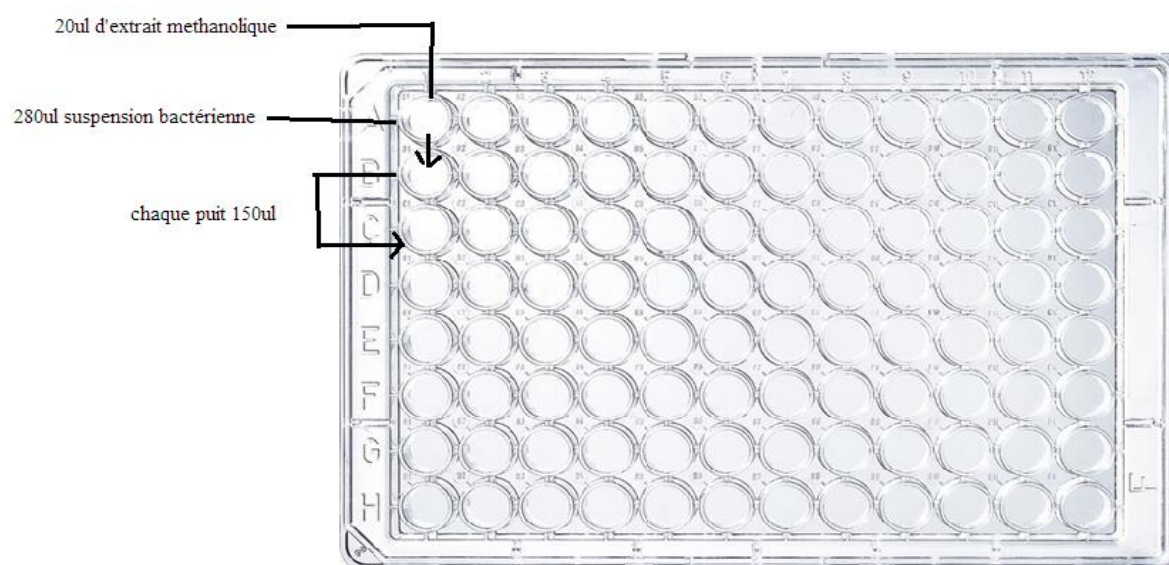


Figure 21 : Représente la protocole dans microplaque 96 puits

Résultats

1. Le rendements de l'extrait méthanolique d'*Artemisia campestris* :

$R = (\text{poids de l'extrait obtenu} / \text{poids de la matière végétale totale}) \times 100$

$$R = (2,03458/10) * 100 = 20,3458$$

$$R = 20.3458\%$$

2. Le rendements de l'extrait méthanolique d'*Artemisia herba alba*:

$$R = (1.907/10) * 100$$

$$R = 19.07\%$$

3. La concentration de l'extrait méthanolique d'*Artemisia campestris* :

$$[C] = 234.58\text{g/l}$$

4. La concentration de l'extrait méthanolique d'*Artemisia herba alba* :

$$[C] = 381.4\text{g/l}$$

5. Evaluation de l'activité antibactériennes :

5.1. La croissance des souche bactériennes :

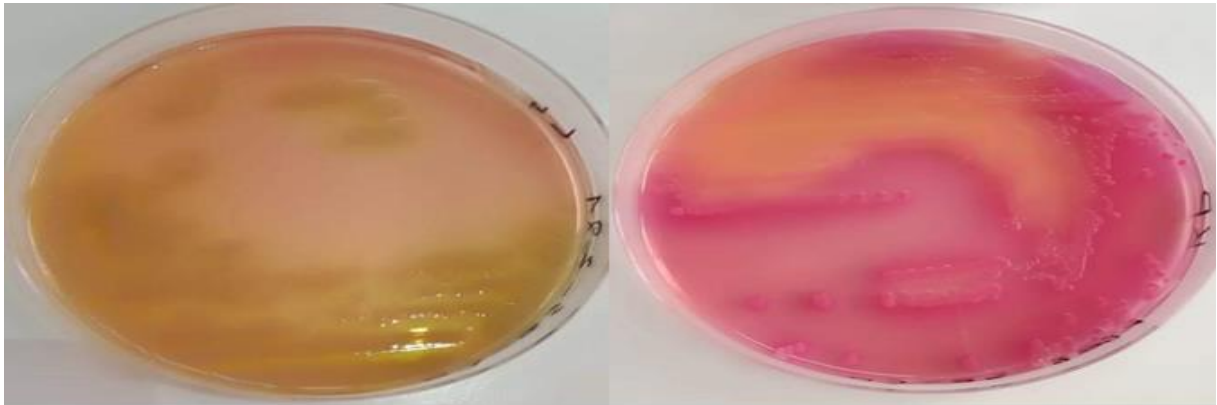


Figure22 : *Pseudomonas aeruginosa* , Souche de référence *Klebsiella pneumoniae* Atcc7006030 en mackonky

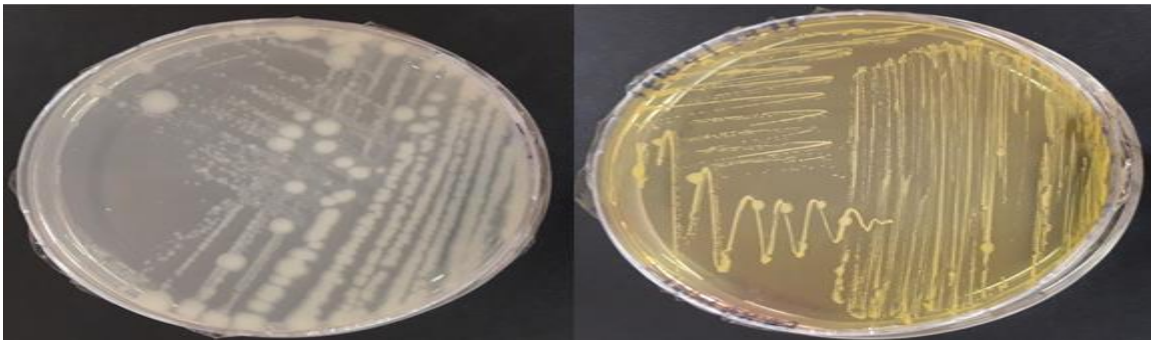


Figure23 : *Bacillus ceureus* en gélose nutritive, *staphylococcus aeureus* en chapman

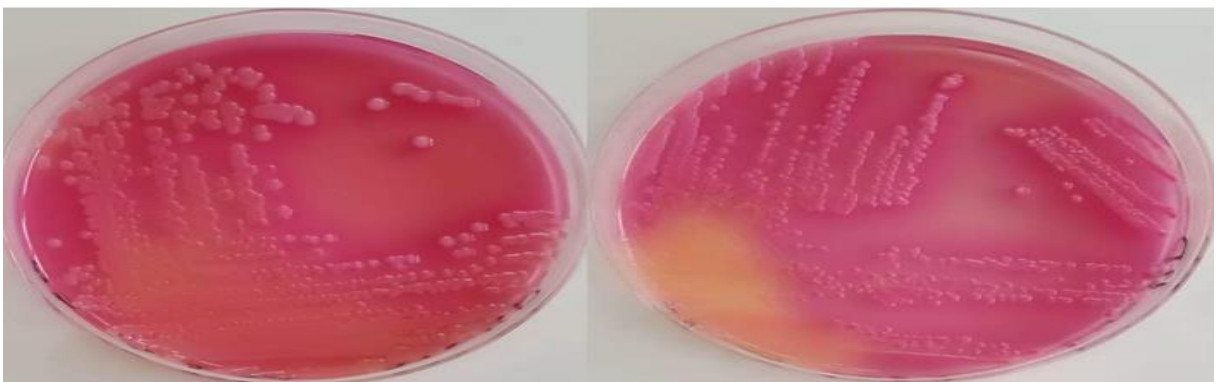


Figure 24 : *klebsiella pneumoniae* s35 , *klebsiella pneumoniae* f40

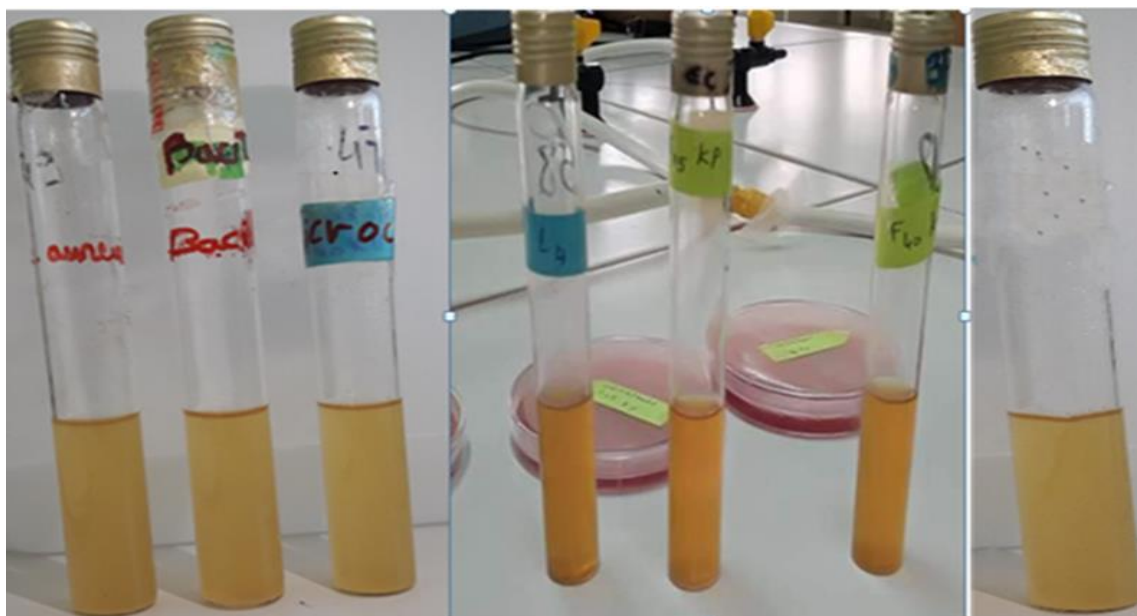


Figure 25 : Représentation des souche bactérienne cultivé dans le BHIB après l'incubation, *staphylococcus aureus*, *Bacillus ceureus* , *micrococcus luteus* , *Pseudomonas aeruginosa*, *klebsiella pneumoniae s35*, *klebsiella pneumoniae F40* , et la Souche de référence *Klebsiella pneumoniae Atcc7006030*)

5.2 .Méthode de diffusion sur gélose : (méthode des puits)

La méthode permet de mettre en évidence le pouvoir antimicrobienne de deux extrait méthanolique.

5.2.1 . L'activité de l'extrait méthanolique d'*Artemisia campestris* :

Il y a aucune activité d'extrait sur les souche multirésistant *Pseudomonas aeruginosa*, *klebsiella pneumoniae(f40)* , *klebsiella pneumoniaes(s35)*, et souche de référence *Klebsiella pneumoniae Atcc7006030*. au contraire on a remarqué une activité antimicrobienne moyenne contre *Bacillus ceureus*, *staphylococcus aureus*, *micrococcus luteus* avec des zones d'inhibitions de 18mm,15mm,17mm respectivement.

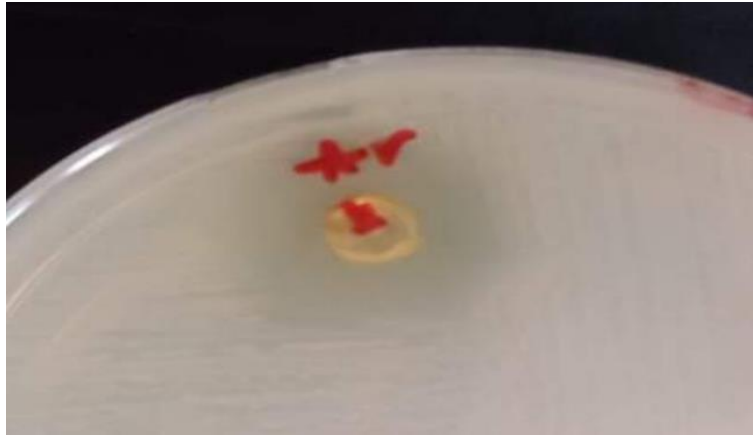


Figure 26 : Activité antimicrobienne d' *Artemisia campestris* sur *Micrococcus luteus*

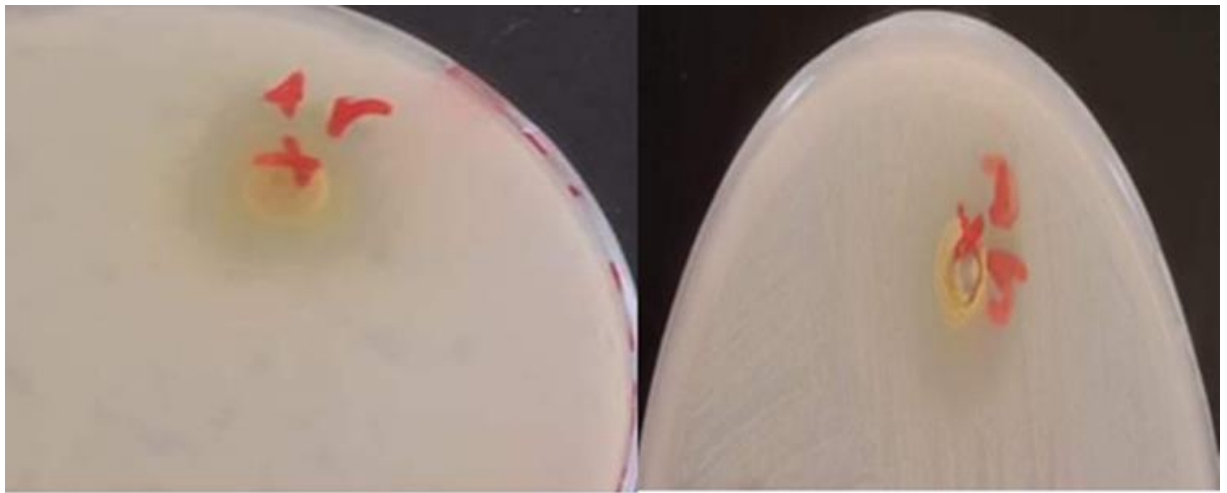


Figure 27 : Activité antimicrobienne d' *Artemisia campestris* sur *Bacillus cereus* (à gauche), et sur *Staphylococcus aureus* (à droite)

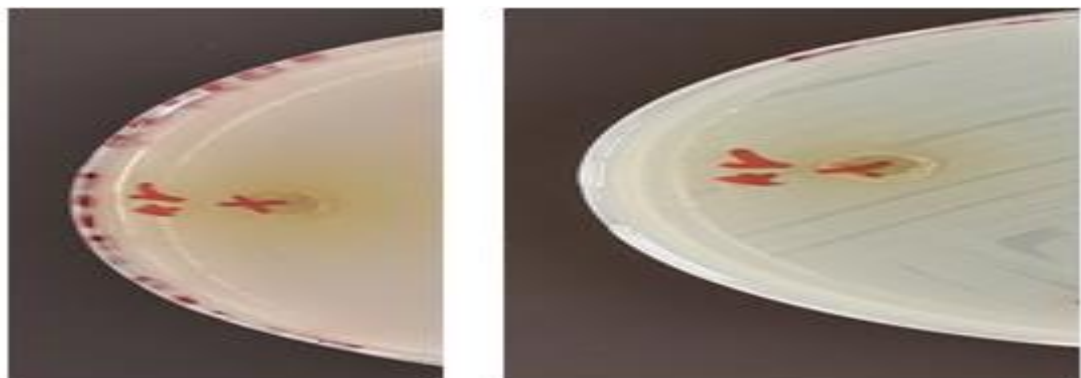


Figure 28 : Activité antimicrobienne d' *Artemisia campestris* sur *Pseudomonas aeruginosa*, et *Klebsiella pneumoniae* Atcc7006030)

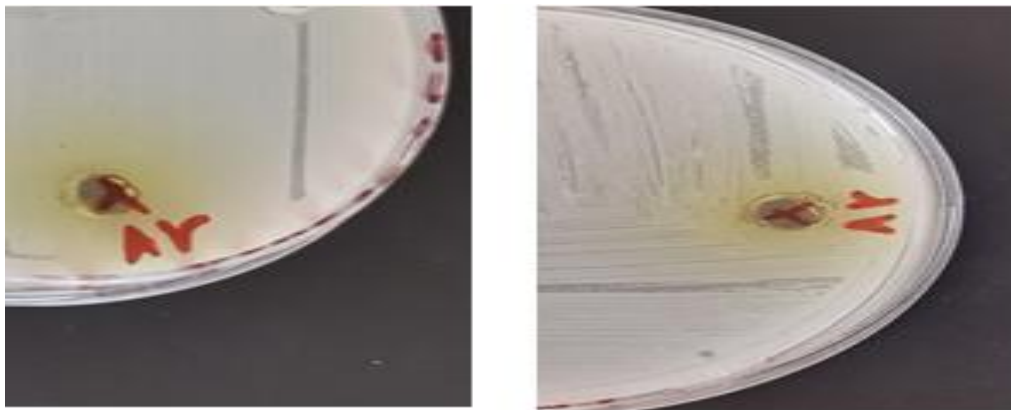


Figure 29 : activité antimicrobienne d'*Artemisia campestris* sur *Klebsiella pneumoniae*
S 35et F40

5.2.2. L'activité de l'extrait méthanolique d'*Artemisia herba alba* :

Aucune activité antimicrobienne d'extrait a été observée contre les souche multirésistant *Pseudomonas aeruginosa*, *klebsiella pneumoniae*(f40) , *klebsiella pneumoniae*(s35), et la souche de référence *Klebsiella pneumoniae* Atcc7006030.

On observe une activité modérée contre les souches : *Bacillus ceureus*, *staphylococcus aeureus*, *micrococcus luteus* avec des zones d'inhibitions 14mm, 12mm, 18mm.

Pour les dilution 1/100 et 1/10 ne possèdent aucun effet sur toute les souches bactérienne testées.

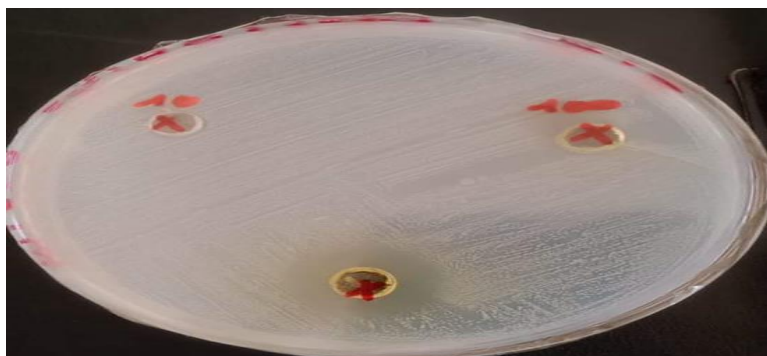


Figure 30 : Activité antimicrobienne d'*Artemisia herba alba* sur *micrococcus luteus*

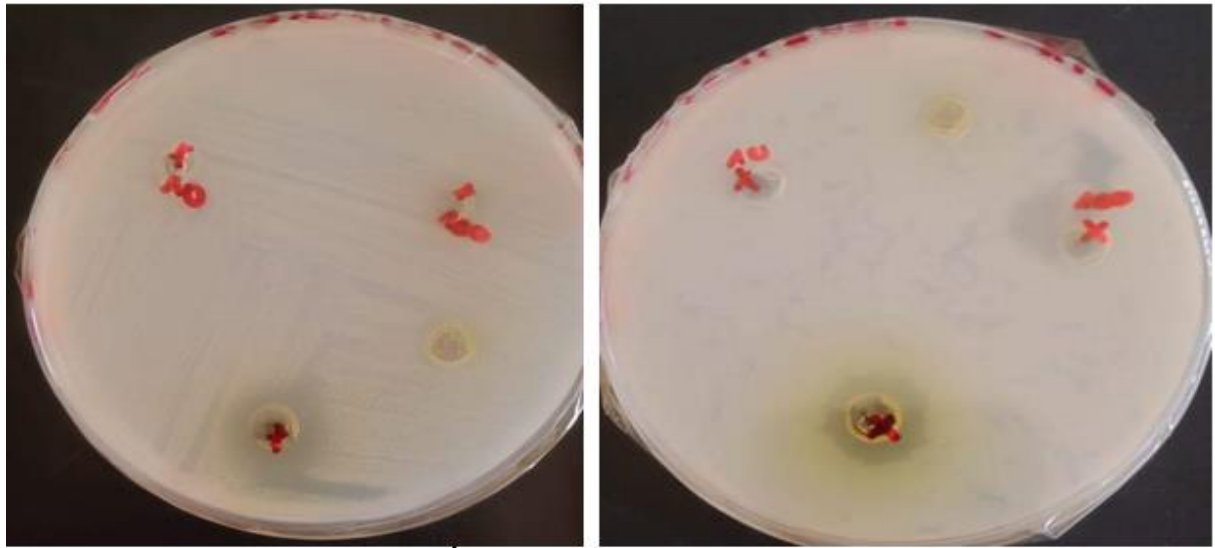


Figure31 : Activité antimicrobienne d'*Artemisia herba alba* sur *staphylococcus aureus*(a gauche), et *Bacillus cereus*.(a droite)

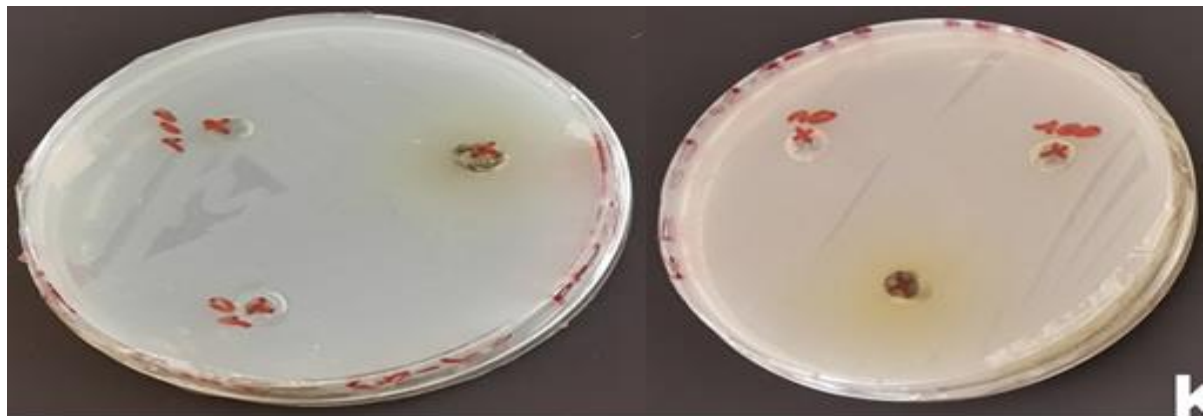


Figure32 : Activité antimicrobienne d'*Artemisia herba alba* sur *Pseudomonas aeruginosa*, *klebsiella pneumoniae Atcc7006030*.



Figure33 : Activité antimicrobienne d'*Artemisia herba alba* sur *klebsiella pneumoniae f40*, *klebsiella pneumoniae s35*

Le tableau ci-dessous représente Diamètre de la zone d'inhibition (mm) :

	<i>Diamètre de la zone d'inhibition (mm)</i>			
	<i>Artemisia campestris</i>	<i>Artemisia herba alba</i>		
<i>Les souche bactériene</i>	<i>Extrait pure</i>	<i>Extrait pure</i>	<i>Dilution1/100</i>	<i>Dilution1/10</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-
<i>klebsiella pneumoniae s35</i>	-	-	-	-
<i>klebsiella pneumoniae f40</i>	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae Atcc7006030</i>	-	-	-	-
<i>Bacillus ceureus</i>	18	14	-	-
<i>staphylococcus aeureus</i>	15	12	-	-
<i>micrococcus luteus</i>	17	18	-	-

Tableau06 : Diamètre des zone d'inhibition

6. Evaluation de l'activité antibiofilm :

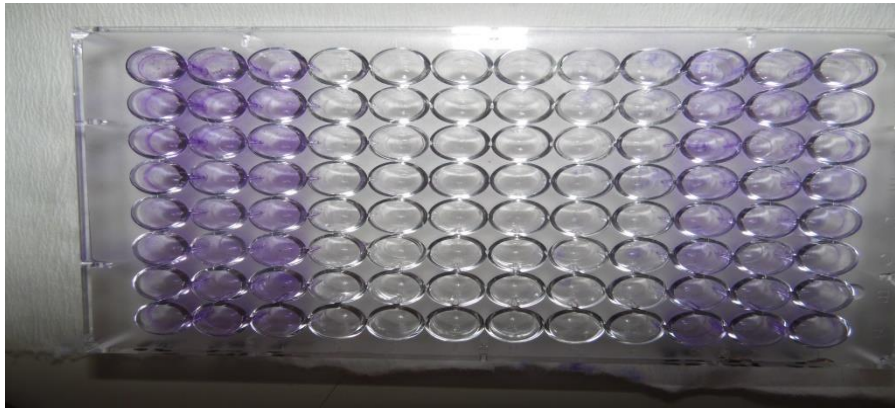


Figure34 : Résultat d'activité anti biofilm

Les souche bactérienne testé *Pseudomonas aeruginosa*, les deux souches de *klebsiella pneumoniae* , et la Souche de référence *Klebsiella pneumoniae* Atcc7006030) possède la capacité de formé la biofilm.

On a remarqué que les deux extraits méthanolique de deux plants *Artemisia campestris* et *Artemisia herba alba* ne présent aucun effet sur la formation de biofilm chez toute les souche testé ,

Discussion

Artemisia campestris, a révélé plusieurs activités pharmacologiques telles que des effets antimicrobiens, antioxydants, cytotoxiques, insecticides, antivenimeux et de nombreux autres effets pharmacologiques. La plante contient de nombreux composés doués d'une activité antimicrobienne telle que les alcaloïdes, les saponines, les terpènes et les flavonoïdes.(1) *Artemisia herba alba* est largement utilisée pour le traitement de plusieurs maladies, les feuilles sont largement utilisées dans la médecine traditionnelle comme une décoction antivenimeuse, anti-inflammatoire (rhumes, la toux, la bronchite, la diarrhée), (maladies de la peau, la gale, la syphilis) anti-infectieux(2,3). Des études phytochimiques de cette plante ont révélé l'existence de nombreux composés bénéfiques tels que l'herbalbine, l'acétate de cis-chrysanthényle, les flavonoïdes (hispiduline et cirsilinéol), les monoterpènes, les sesquiterpènes. Les parties aériennes se caractérisent par un très faible degré de toxicité. (4)

L'objectif principal de notre travail est d'inhiber la croissance des souches bactériennes multirésistantes isolées à partir d'un milieu hospitalier par l'extrait méthanolique de deux plantes, et déterminer les molécules impliquées dans l'inhibition de l'enzyme bêta-lactamase à spectre élargi produite par ces souches.

D'après les résultats obtenus, nous ne trouvons aucune activité sur les souches de *Klebsiella pneumoniae*, et *Pseudomonas aeruginosa*, alors que nous avons remarqué une activité inhibitrice moyenne chez les deux extraits méthanoliques des deux plantes contre *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*. C'est-à-dire les molécules d'*Artemisia campestris*, et d'*Artemisia herba alba* ne présentent aucun effet sur l'enzyme bêta-lactamase à spectre élargi produite par *Pseudomonas aeruginosa*, et *Klebsiella pneumoniae*.

Ces bactéries développent plusieurs mécanismes de résistance, *K. pneumoniae* résiste naturellement à l'ampicilline et aux carbénicillines par la production de pénicillinases chromosomiques, et aussi résiste aux céphalosporines 3^e génération surtout par production de bêta-lactamase à spectre étendu comme SHV, TEM, CTX-M (3). De nombreuses épidémies nosocomiales causées par cette bactérie ont été décrites, notamment chez les personnes ayant un système immunitaire affaibli, comme les diabétiques et les alcooliques. Elle peut se propager rapidement entre les patients hospitalisés surtout dans des unités de soins intensifs adultes ou pédiatriques(31).

Pseudomonas aeruginosa est un pathogène nosocomial majeur, en particulier chez les patients atteints de mucoviscidose et dans les services de réanimation. Cette souche est définie par la résistance à au moins trois des quatre principales classes d'antibiotiques anti-*Pseudomonas* (pénicillines/céphalosporines, monobactames, carbapénèmes, aminosides et fluoroquinolones).(5)

L'acquisition de résistances aux β -lactamines chez *Pseudomonas aeruginosa* résulte de mutations entraînant une surproduction de la céphalosporinase constitutive AmpC, une surexpression des systèmes d'efflux actif, une diminution de perméabilité membranaire et l'acquisition de gènes exogènes. La dissémination de β -lactamases à spectre étendu, de métallo-carbapénémases et d'oxacillinasés à spectre élargi est un phénomène émergent que le biologiste doit pouvoir rapidement évoquer.(6)

Quelques recherches qui s'intéressent à l'étude de l'activité antimicrobienne d'*Artemisia campestris* :

Ben Sassi et al (2007), ont étudié l'activité antimicrobienne des extraits de la partie aérienne *Artemisia campestris*, ils ont trouvé que seul l'extrait d'acétone exerce un effet inhibiteur parmi les trois extraits (acétone, hexane, méthanol). (57)

Naili et al (2010), ont étudié l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique des feuilles d'*A. campestris*. Contre *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, , *Salmonella typhi* les résultats obtenus ont montré que cet extrait possède un effet inhibiteur sur toutes les bactéries étudiées.(70)

Tharib.,et al(1983), ont été étudié l'activité antimicrobienne de la partie aérienne d'*Artemisia campestris* , ils ont trouvé que certain composé possède une forte activité contre *staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* et une activité faible contre *Proteus vulgaris*.(69).

Karabegović et al. (2011) ont été trouvés que deux types d'extraits méthanoliques préparés différemment à partir de la partie aérienne de la plante possèdent une activité

antimicrobienne contre *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*.(64).

*Deuxième partie : étude in
silico*

L'objectif essentiel de notre travail et de cette partie est une initiation aux approches de modélisation par docking moléculaire afin de proposer de nouveaux inhibiteurs de la beta lactamase à spectre étendu . ces inhibiteur sont des molécules extraire appartienne d'une plante médicinale .

Des étude antérieures vitro aux Philippine montré que la plant *Piper betle* (*P. betle*) avait une grande valeur potentielle contre les bactéries Gram-négatives et Gram-positives multirésistantes .

Cette étude a résolument établi l'efficacité de l'extrait éthanolique des feuilles de *P. betle* contre des bactéries MDR à Gram-positives et Gram-négatives connues, ce qui indique que la plante produit des composés qui sont capables de combattre les défenses bactériennes.

P. betle est une plante médicinale multifonctionnelle, qui est cultivée dans toutes les Philippines et que l'on trouve également dans d'autres pays comme la Malaisie et l'Inde. pays, . Les feuilles ont été traditionnellement utilisées pour contrôler les caries, les maladies parodontales et la prévention de l'halitose, et il est prouvé qu'elles ont des propriétés gastro-intestinal et hépatoprotecteur .

Une chromatographie liquide à haute performance en phase inversée avec détection par barrette de diodes (HPLC-DAD) a été mise au point et validée pour estimer les différents composés phénoliques de *Piper betle* ((acide gallique, acide caféique, acide syringique, acide p-coumarique, acide sinapique et acide ferrulique, catéchine, , quercetin , rutine, myricétine, , apigénine et kaempférol ,ferluc, acide clavulanique, et l'eugénol).

Donc en va faire une étude in silico complémentaires pour confirmer leurs résultats et déterminé exactement la molécule actif.

1. Matériels :

1.1. Microordinateurs :

Nous avons utilisé deux micro-ordinateurs puissants avec une mémoire vive de 4 GO . Tous les programmes utilisés sont installés sous le système d'exploitation Windows 10- 64 bits .

2.2 .Programme (logiciels) :

AutoDock Tools :

Concernant le programme du docking moléculaire, nous avons utilisé AutoDock version 4.2.6 afin de simuler les interactions Enzyme-inhibiteur .

Le protéine et les ligands utilisés dans ce travail étant en général sous le format PDB sont convertis au format pdbqt par le programme AutoDock Tools.

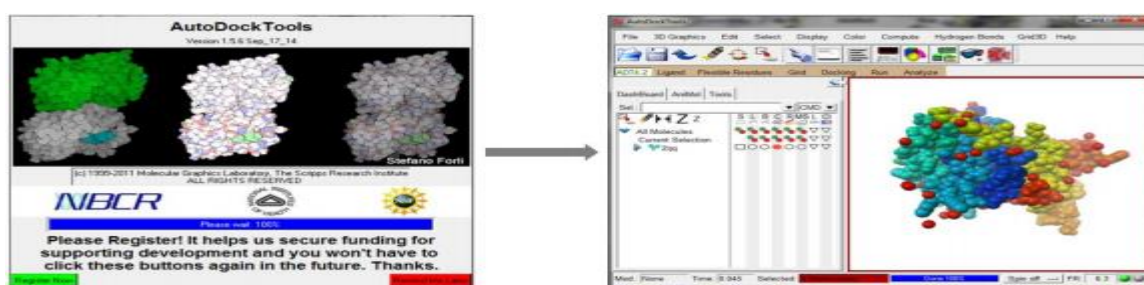


Figure 35 : L'interface graphique AutoDock Tools.

Accelry Discovery Studio Visualizer:

Discovery Studio Visualiser est un logiciel complet de construction, visualisation des structures et des séquences biomoléculaires, ainsi que d'alignement multiple de séquences et superposition de structures spatiales.

1.3. Banques de données :

PDB

et

Pubchem



Figure 36: Interface d'accueil du PDB et PubChem

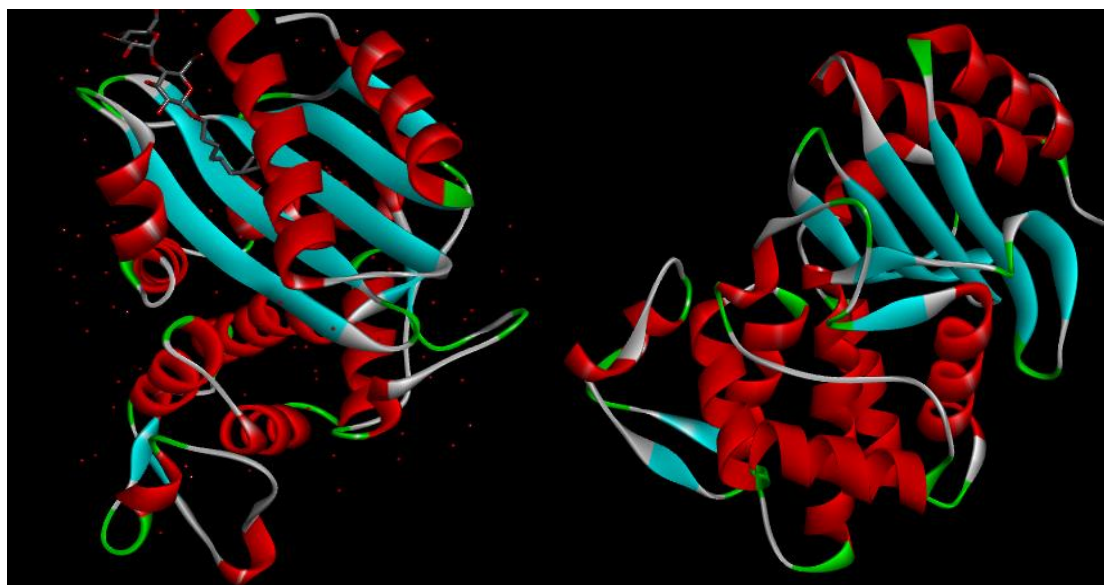
2. Méthodes :

2.1. Préparation de la protéine SHV-1 Beta-lactamase :

La structure 3D de la Bêta-Lactamase, a été obtenue via la banque de donnée PDB. Cette dernière nous a proposé plusieurs structures cristallographiques de complexes Bêta-Lactamases-Inhibiteur, nous avons choisi le codes SHV_1 correspondant à la classe A de la Bêta-Lactamase.(protéine sécrété par la souches *Klebsiella pneumonia*).

Leur préparation pour l'amarrage s'effectue comme suit :

- ✓ Elimination des molécules d'eau, et le ligand pour avoir un modèle simplifié de la protéine. Cette étape est réalisée par le logiciel Accelry Discovery Studio (version 4.0). Figure(18).
- ✓ La structure est enregistrée en format PDB.
- ✓ L'importation de la protéine dans le logiciel autodock et l'ouvrier.
- ✓ les hydrogènes polaires et les charges de Kollman partielles ont été ajoutés aux protéines et La structures est enregistrée en format PDBQT.



(1)

(2)

Figure 37 : Structure de **SHV-1** non simplifié (1) et simplifiée (2).

2.2.Préparation des Ligands :

Les structures des composé inhibiteurs ont été téléchargée via la base Pubchem. La préparation des ligands a été effectuée par minimisation d'énergie en utilisant l'algorithme de Gasteiger, en détectant la racine et en définissant le nombre de torsions pour avoir de bonnes conformations prêtes à être dockées dans le site . (cette préparation a été réalisée sur AutoDock Tools).

Les ligands ont été enregistrés sous forme de fichiers PDBQT.

3.3.Docking Moléculaire :

Pour la troisième étape, il s'agit de l'utilisation d'un logiciel particulier « 'AutoDock Tools 1.5.4 » pour évaluer l'énergie de liaison la plus faible entre les ligands et les acides aminé du site actif de la protéines « SHV-1 » en appliquant des paramètres de docking pour bien analyser les résultats.

Le même programme a également été utilisé pour sélectionné les acides aminé formatrice du site active de la protéine SHV-1 beta-lactamas (Sérine(ser70) , sérine(ser130), lysine (lys73), acide glutamique(glu166) , asparagine(asn170),

thréonine(thr167), tyrosine (tyr105), asparagine (asn132), lysine(lys234), thréonine(thr235), Arginine(arg244), alanine(ALa237), valine(val216) .) et crée, une boîte GRID (GRID BOX) pour couvrir tous les résidus du site actif afin de définir l'espace de recherche conformationnel du ligand à docké.

(On a obtenu Les résidus des acides aminé du site active de la protéine SHV-1 beta_lactamas par des recherches bibliographique dans les article scientifiques).

Les paramètres sont motionnés dans le tableau suivant :

Protéine	Centre X	Centre Y	Centre Z	Size X	Size Y	Size Z
SHV-1	7.998	30.604	2.928	58	52	44

Tableau 07 : Les paramètres de La GRID BOX pour la protéine SHV-1.

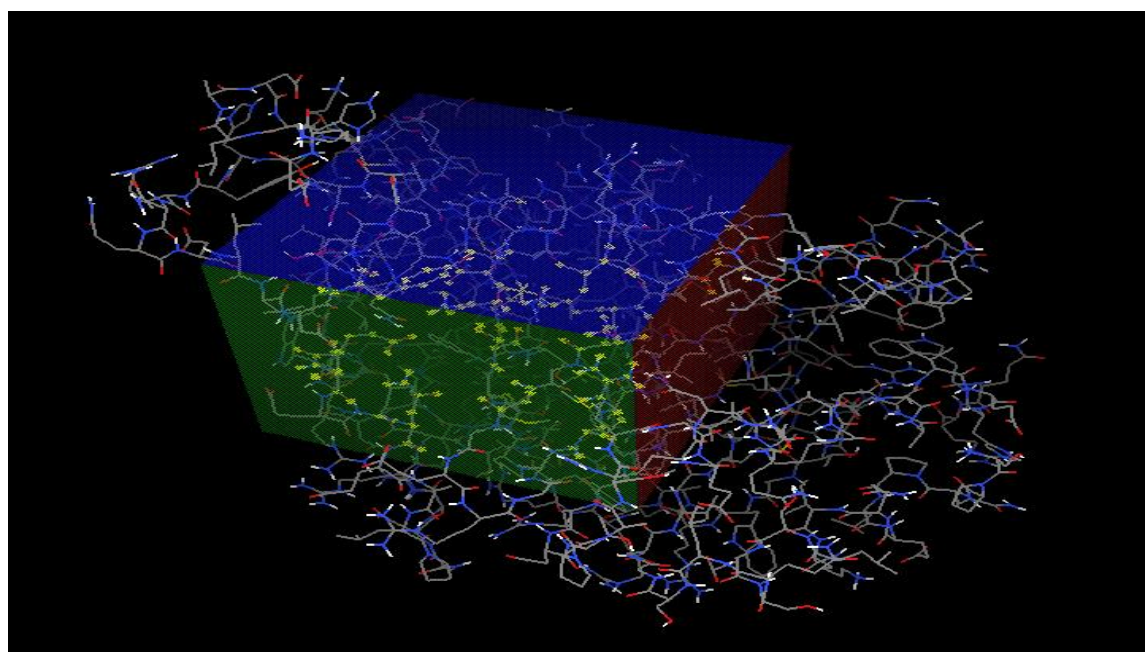


Figure 38 : Positionnement du ligand dans grille tridimensionnelle du site actif.

Les paramètres par défaut ont été utilisés, sauf que le nombre de conformations de sortie a été fixé à 9. Les conformations préférées sont celles dont l'énergie de liaison est la plus faible dans le site actif. Enfin, les résultats de docking générés ont été directement

chargés dans Discovery Studio visualiseur pour visualiser et scruter l'interaction entre les fragments des ligands avec la protéine SHV-1.

Résultats et discussion

L'évaluation des 13 poses des molécules inhibitrice avec la protéines B-lactamase a spectre élargie (SHV-1) basée sur leur Score, leur énergie libre de liaison, et leur mode de liaison , Les types d'interactions formées sont déduits de l'exploitation des données fournie par le logiciel Discovery : liaisons hydrogène, liaisons hydrophobes et électrostatiques Les résultats sont représentés dans les tableaux et les figures suivants :

On a utilisé l'Avibactam comme un contrôle positive.

« Avibactam est une molécule du médicament inhibiteur de bêta-lactamase administré en association avec des antibiotiques ».

➤ Avibactam -SHV-1

Ligands inhibiteur	Score d'amarrage	Interaction d'amarrage ligand/récepteur
Avibactam	-5,5	

Tableau 08 : Interactions d'amarrage Avibactam -SHV-1 .

L'analyse visuelle montre que ce composé est bien positionné au sein du site actif de SHV-beta lactamase (voir le tableau 07) en formant 4 liaisons hydrogènes . Les liaisons sont formées entre le composé SHV-1 et les résidus (Ser130,Asp104, Arg244,Thr235) et une interaction hydrophobe entre la protéine SHV-1 et le résidu Ala237 ,dont **Ala237, SER130, Arg244,Thr235** sont les AA formatrice du site active . (les acides aminé coloré en jaune sont les AA du **site active**) .

➤ Kaempferol-SHV-1

Ligands inhibiteur	Score d'amarrage	Interaction d'amarrage ligand/récepteur
Kaempferol	-9.1	

Tableau 09 : Interactions d'amarrage Kaempferol-SHV-1 .

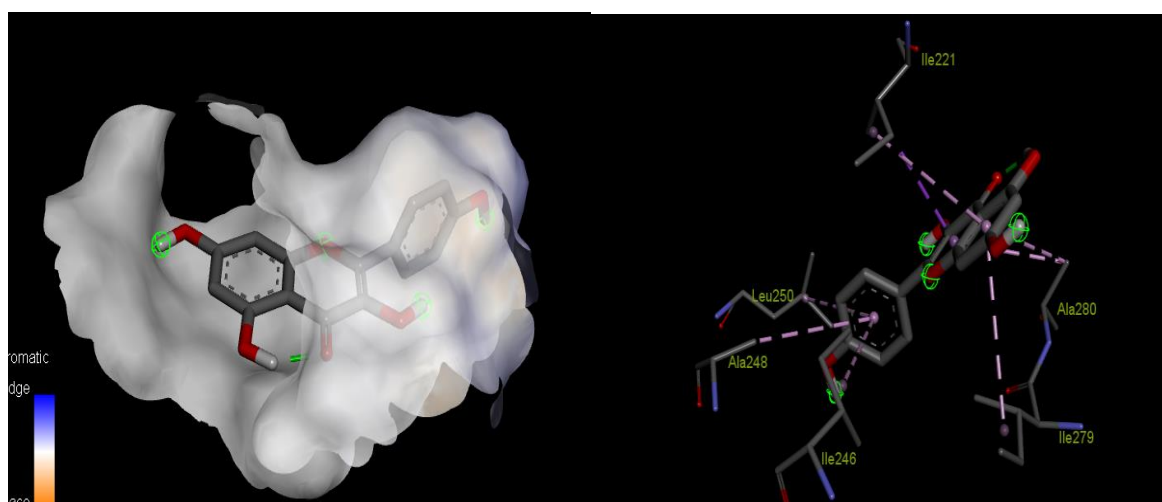


Figure 39 : Représentation 2D et 3D du positionnement du Kaempferol dans le site actif de SHV-1 Bêta-Lactamase .

L' interactions Kaempferol-SHV-1 est impliqué dans un type de liaison hydrophobe avec les résidus d'acides aminés Ala280,Ile279,Ala248,Leu250,Ile246 face à Pi-alkyl et (Ile221) face à Pi-sigma .

➤ P-coumaric Acid - SHV-1 :

Ligands inhibiteur	Score d'amarrage	Interaction d'amarrage ligand/récepteur
P-coumaric Acid	-6.5	

Tableau 10 : Interactions d'amarrage P-coumaric Acid - SHV-1.

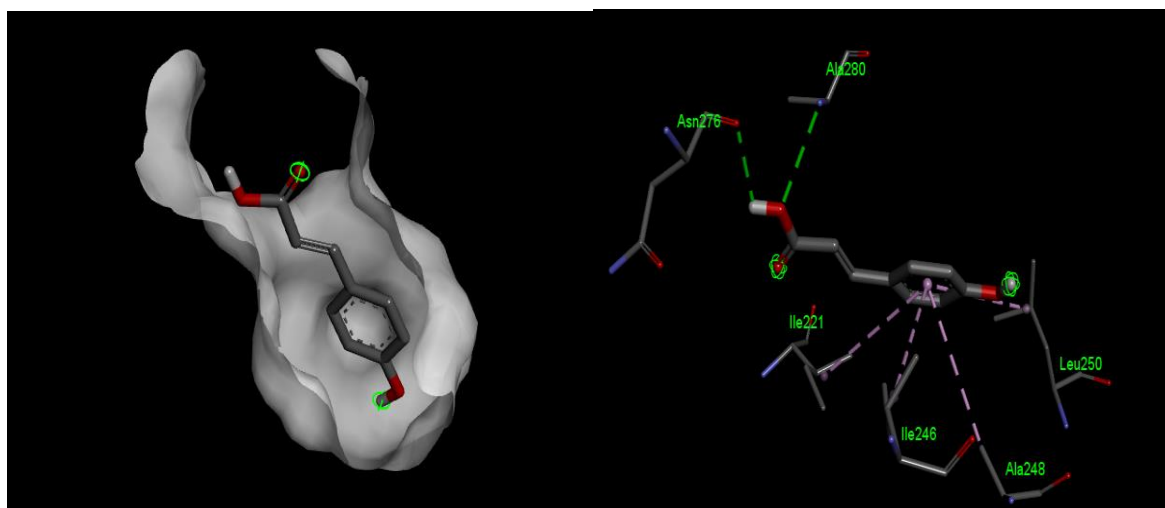


Figure 40 : Représentation 2D et 3D du positionnement du

P-coumaric Acid dans le site actif de SHV-1 Bêta-Lactamase.

L'analyse visuelle montre que le composé P-coumaric Acid inhibe SHV-1 en formant deux liaisons hydrogènes au sein du site actif avec les résidus d'acides aminés (Asn276,Ala280) .De même, 4 interactions hydrophobiques (Pi-alkyl) sont formées entre l'inhibiteur et les résidus Leu250,Ile221,Ile246 ,Ala248 .

➤ Quercetin - SHV-1 :

Ligands inhibiteur	Score d'amarrage	Interaction d'amarrage ligand/récepteur
Quercetin	-9.4	<p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> Carbon Hydrogen Bond Pi-Sigma Pi-Alkyl

Tableau 11 :: Interactions d'amarrage Quercetin - SHV-1.

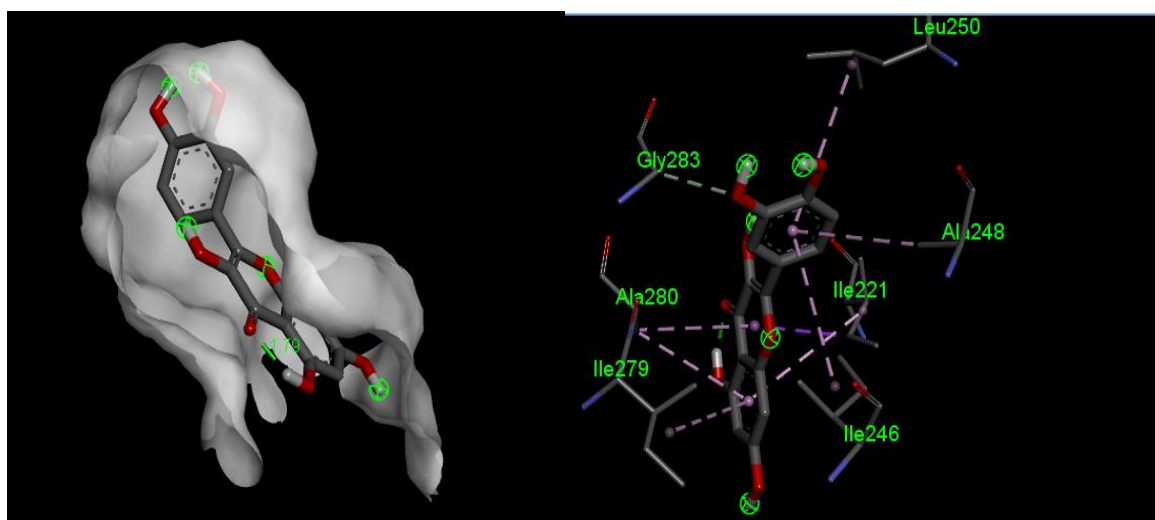
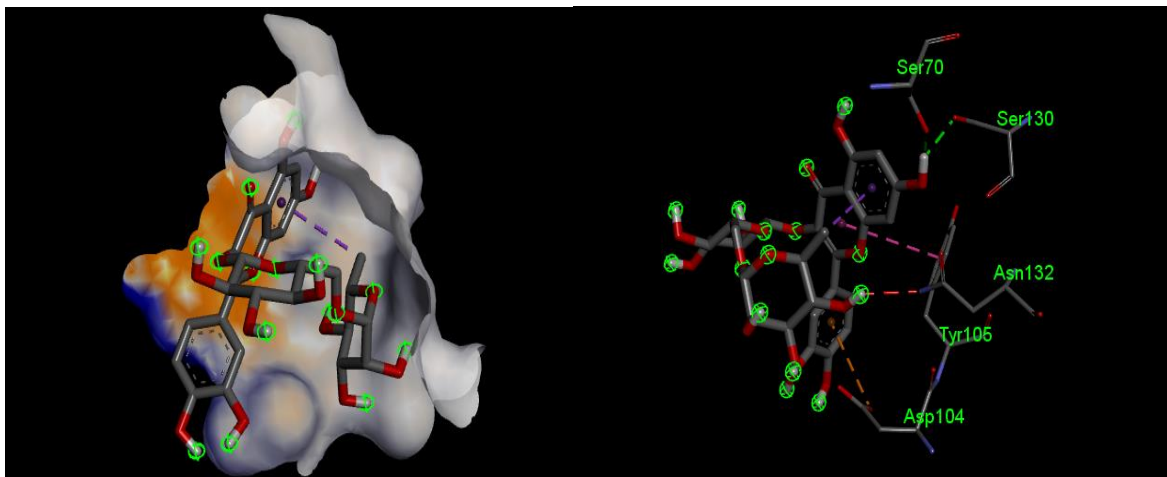


Figure 41 : Représentation 2D et 3D du positionnement du Quercetin dans le site actif de SHV-1 Bêta-Lactamase.

L'interactions Quercetin -SHV-1 est impliqué par la formation des liaisons hydrophobes (5 Pi-alkyle), (Liaison Pi-sigma), (liaison Carbon hydrogen) avec les acides aminés suivants : (Ala280,Ile279,Ile246,Ala248,Leu250), (Ile221) ,et (Gly283), respectivement . Cet molécule ne forme aucune liaison hydrogène.

➤ Rutin- SHV-1 :

Ligands inhibiteur	Score d'amarrage	Interaction d'amarrage ligand/récepteur
Rutin	-9,9	<p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ Conventional Hydrogen Bond ■ Unfavorable Donor-Donor ■ Pi-Anion ■ Pi-Pi T-shaped

Tableau 12 : Interactions d'amarrage Rutin- SHV-1.**Figure 42 :** Représentation 2D et 3D du positionnement du Rutin dans le site actif de SHV-1 Bêta- Lactamase.

Les résultats ont montré que ce composé est impliqué dans deux types d'interactions 2 interactions de liaisons hydrogène avec **Ser70 ,Ser130** , et des interactions hydrophobes : Unfavorable donordonor avec **Asn132** ,liaison Pi-anion avec Asp104 et liaison Pi-pi T- SHAPED avec **Tyr105** . La plus part des Aa de cette interaction sont les AA formatrice du site active Ce qui indiquent une interaction forte et stable entre ce ligand et le site actif de l'SHV-1Bêta-Lactamase.

Sinapic acid-SHV 1 :

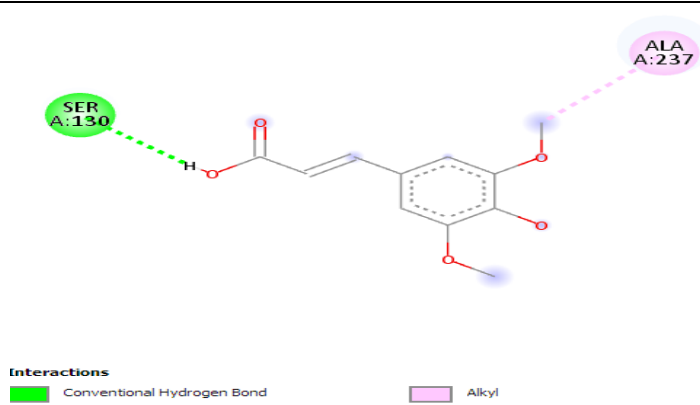
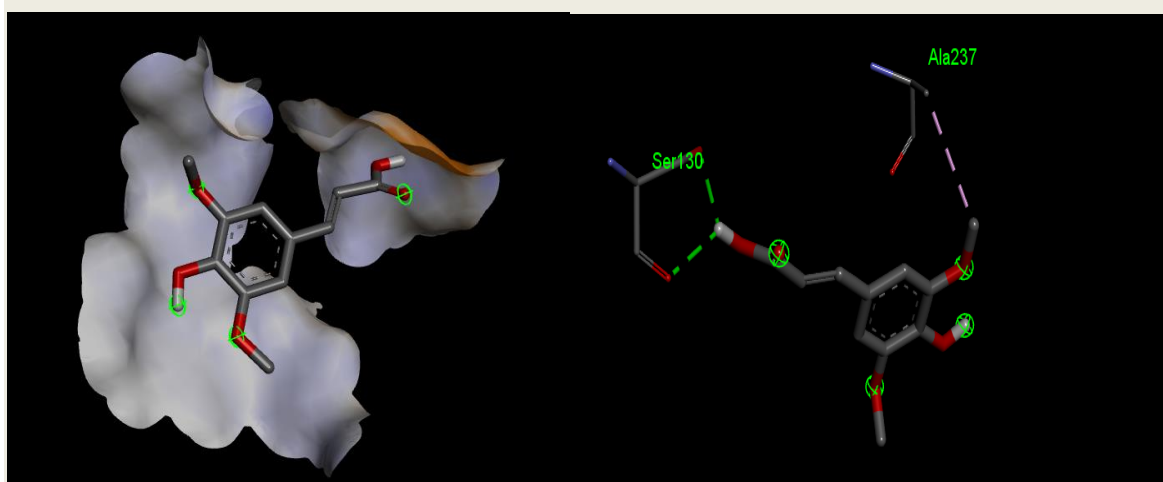
Ligands inhibiteur	Score d'amarrage	Interaction d'amarrage ligand/récepteur
Sinapic acid	-6,3	 <p>Interactions</p> <p>Conventional Hydrogen Bond</p> <p>Alkyl</p>

Tableau 13 : Interactions d'amarrage Sinapic acid-SHV_1.**Figure 43 :** Représentation 2D et 3D du positionnement du Sinapic acid dans le site actif de SHV-1 Bêta-Lactamase.

Le composé Sinapic acid-SHV-1 : interactions de liaison hydrogène avec Ser130 et une interactions hydrophobes avec Ala237 (liaison alkyl).

➤ Syringic acid-SHV 1 :

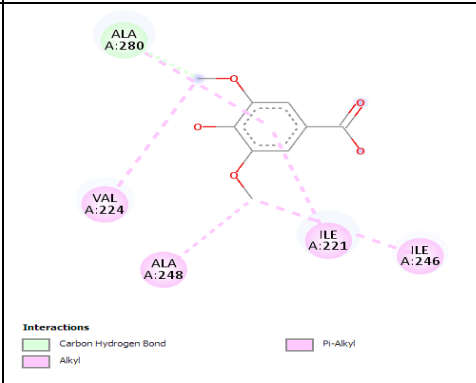
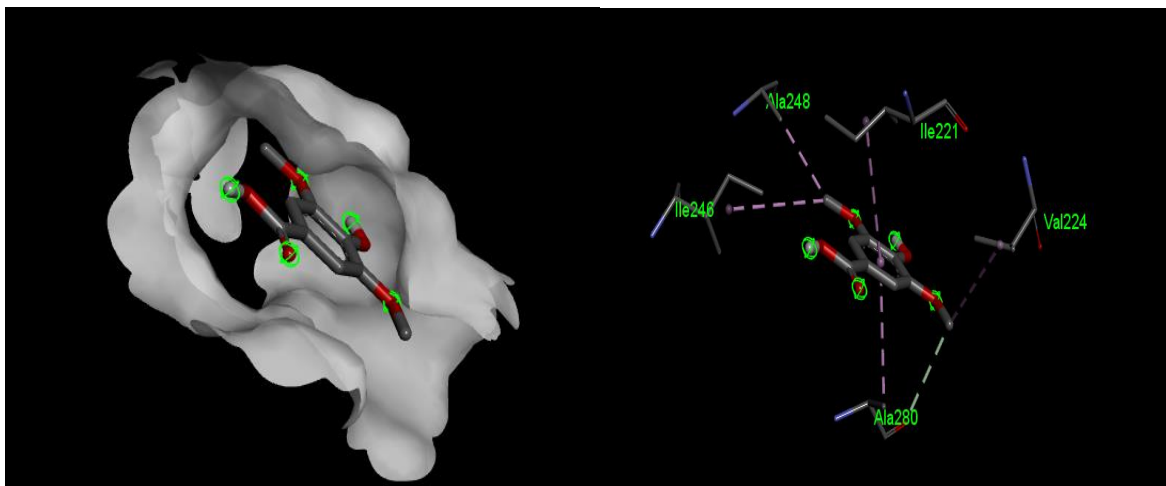
Ligands inhibiteur	Score d'amarrage	Interaction d'amarrage ligand/récepteur
Syringic acid	-5,9	 <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> Carbon Hydrogen Bond Alkyl Pi-Alkyl

Tableau 14: Interactions d'amarrage Syringic acid-SHV_1_**Figure 44:** Représentation 2D et 3D du positionnement du Syringic acid dans le site actif de SHV-1 Bêta-Lactamase.

Le composé Syringic acid-SHV_1 interagi avec 3 liaisons pi-alkyl (Val224,Ala248,Ile221) ,une liaison alkyl (Ile246) et une liaison Carbon hydrogen(Ala280).

➤ Apignin-SHV 1 :

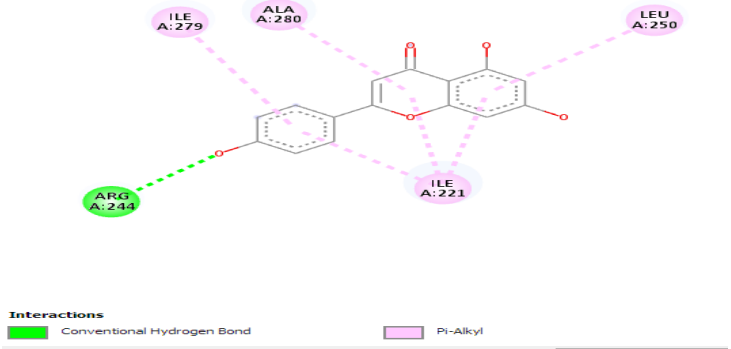
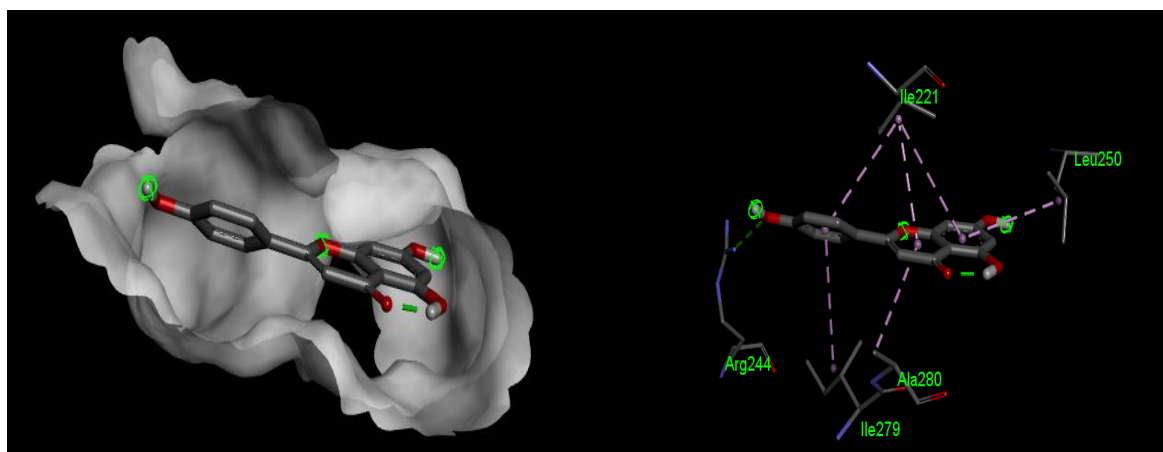
Ligands inhibiteur	Score d'amarrage	Interaction d'amarrage ligand/récepteur
Apignin	-8,8	 <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> Conventional Hydrogen Bond (Green) Pi-Alkyl (Pink)

Tableau 15 : Interactions d'amarrage Apignin-SHV_1.**Figure 45 :** Représentation 2D et 3D du positionnement du Apignin dans le site actif de SHV-1 Bêta-Lactamase.

Pour le composé Apignin-SHV_1 elle est capable de former une interaction hydrophobes : 4 liaison pi-alkyl avec les résidus Ile279,Ala280 Leu 250,Ile221, et une liaison hydrogène(Arg244).

➤ Catechin-SHV-1 :

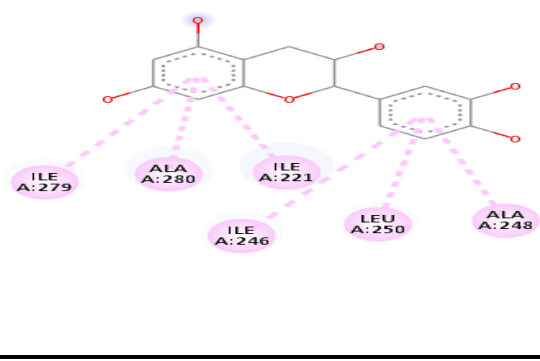
Ligands inhibiteur	Score d'amarrage	Interaction d'amarrage ligand/récepteur
Catechin	-9,4	

Tableau 16 : Interactions d'amarrage Catechin-SHV-1.

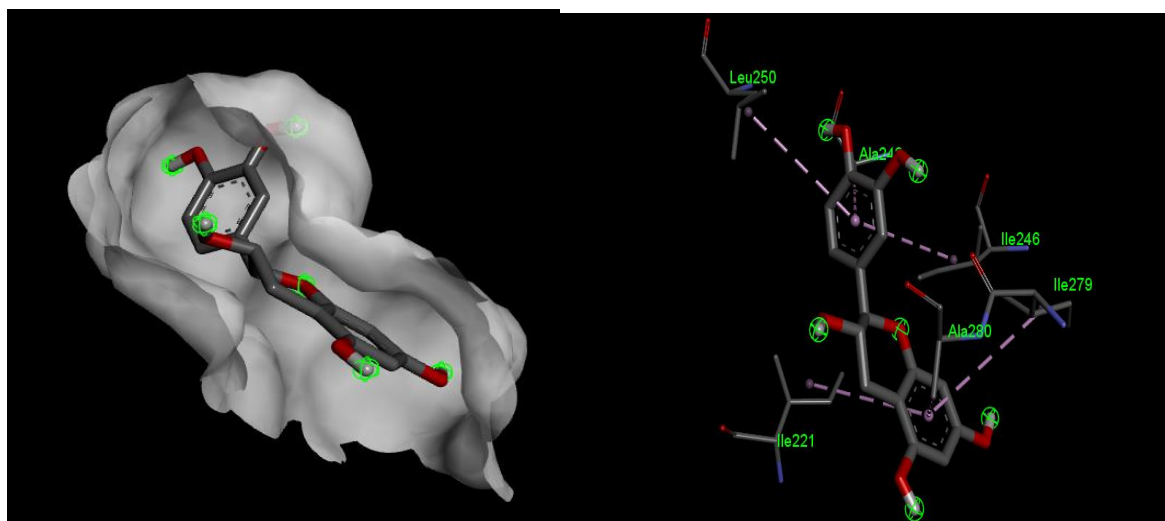


Figure 46 : Représentation 2D et 3D du positionnement du Catechin dans le site actif de SHV-1 Bêta-Lactamase.

Le composé Catechin-SHV-1 interagit seulement avec un seul type d'interaction : 6 liaison pi-alkyl avec les résidus Ile279,Ala280, Ile221, Ile246, Leu250,Ala248.

➤ Eugenol-SHV-1 :

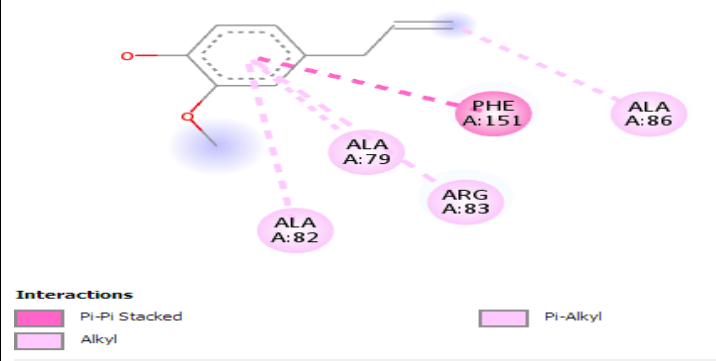
Ligands inhibiteur	Score d'amarrage	Interaction d'amarrage ligand/récepteur
Eugenol	-6.2	

Tableau 17: Interactions d'amarrage Eugenol-SHV-1 .

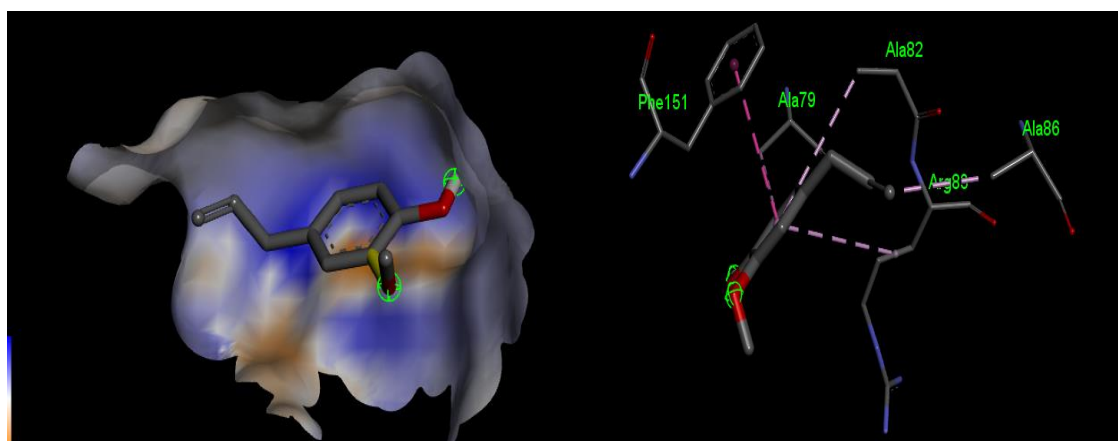


Figure 47 : Représentation 2D et 3D du positionnement du Eugenol dans le site actif de SHV-1 Bêta-Lactamase.

L' interactions Eugenol-SHV-1 est impliqué dans 3 type de liaison hydrophobe avec les résidus d'acides aminés Ala82,Arg83 ,Ala79 face à Pi-alkyl , Ala86 face à Alkyl et Phe151 Face à Pi-PI STACKED.

➤ Gallic acid-SHV-1 :

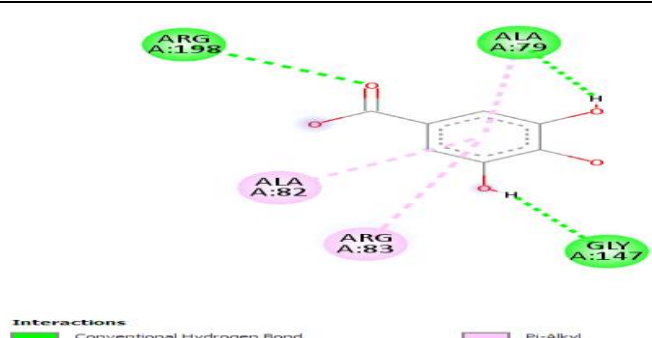
Ligands inhibiteur	Score d'amarrage	Interaction d'amarrage ligand/récepteur
Gallic acid	-6.9	 <p>Interactions</p> <p>Conventional Hydrogen Bond</p> <p>Pi-Alkyl</p>

Tableau 18 : Interactions d'amarrage Gallic acid-SHV-1.

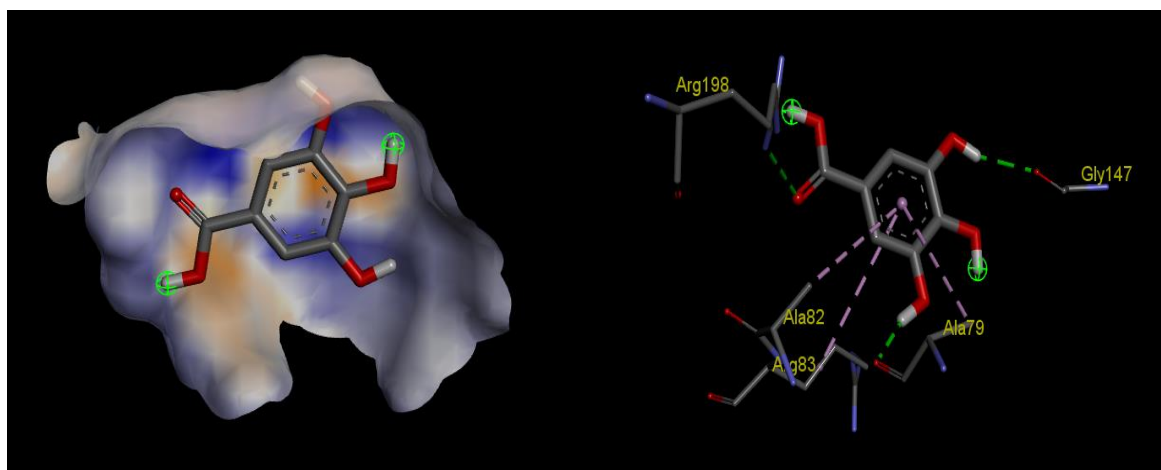


Figure 48 : Représentation 2D et 3D du positionnement du Gallic acid dans le site actif de SHV-1 Bêta-Lactamase.

Les résultats ont montré que Ce composé est impliqué dans deux types d'interactions : 3 liaison hydrogène avec les résidus Arg198,Ala79 ,Gly147 et 2 liaisons hydrophobiques (pi-alkyl)avec les résidus (Ala82,Arg83).

➤ Caffeic acid SHV-1 :

Ligands inhibiteur	Score d'amarrage	Interaction d'amarrage ligand/récepteur
Caffeic acid	-6.5	

Tableau 19: Interactions d'amarrage Caffeic acid SHV-1 .

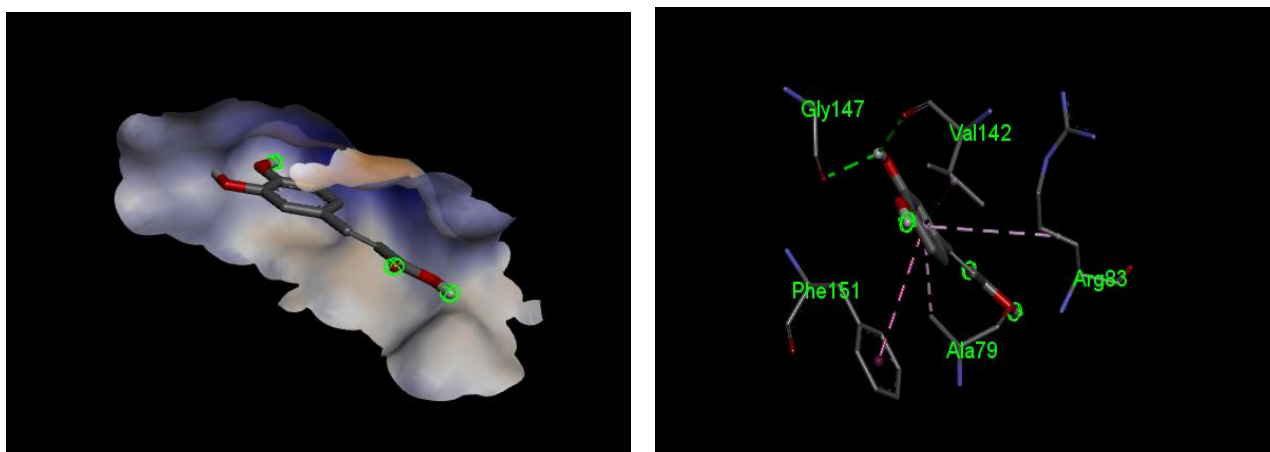


Figure 49 : Représentation 2D et 3D du positionnement du Caffeic acid dans le site actif de SHV-1 Bêta-Lactamase.

Les résultats obtenus ont montré que ce composé également stabilisé par de nombreuses interactions : 2 liaison pi-alkyl avec les résidus Ala79,Arg83Val142 une liaison liaison Pi-PI STACKED(Phe151) et 2 liaison hydrogène (Val142,Gly147).

➤ **Ferulic acid SHV-1 :**

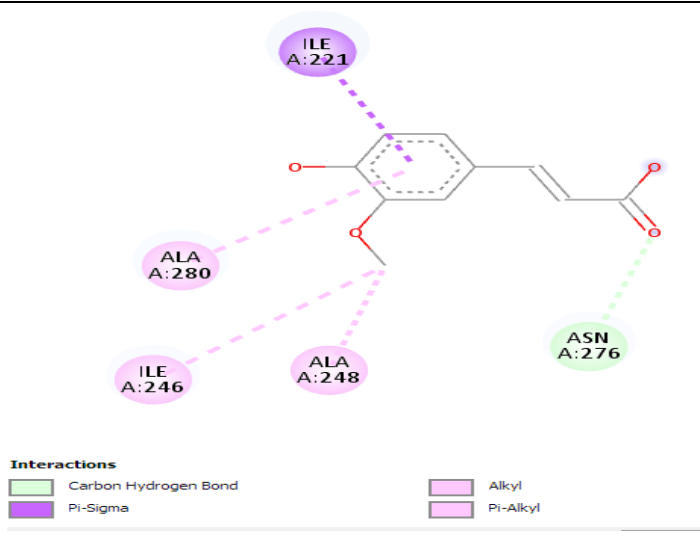
Ligands inhibiteur	Score d'amarrage	Interaction d'amarrage ligand/récepteur
Ferulic acid	-5.7	

Tableau 20: Interactions d'amarrage Ferulic acid SHV-1_

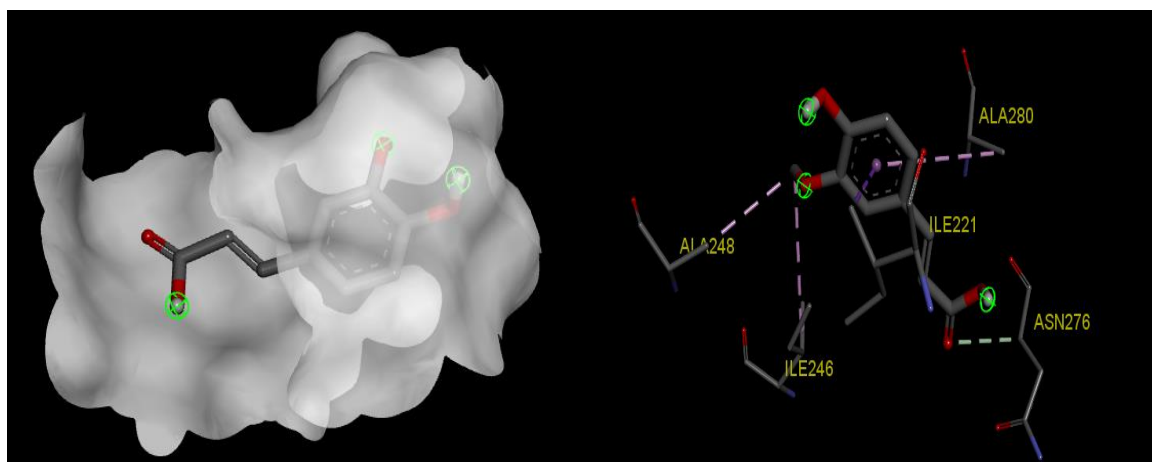


Figure 50: Représentation 2D et 3D du positionnement du Ferulic acid dans le site actif de SHV-1 Bêta-Lactamase.

Ce composé ne forme aucune liaison hydrogène lors de son interaction avec le site actif de l'SHV-1 au profit des nombreuses interactions hydrophobiques avec les résidus suivants qui stabilisent le complexe : Ala248,Ile246 (face à pi-alkyl), Ala248,Ile246 (face à alkyl), Ile212 (face à Pi sigma et Asn276 (face à Carbon hydrogen).

➤ Myricetin SHV-1 :

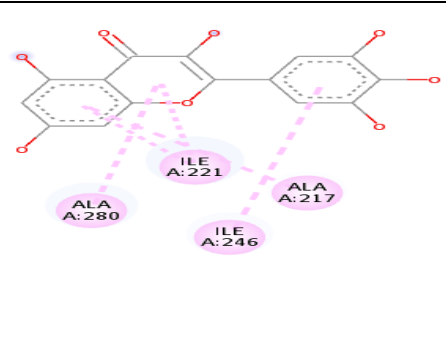
Ligands inhibiteur	Score d'amarrage	Interaction d'amarrage ligand/récepteur
Myricetin	-8.6	

Tableau 21 : Interactions d'amarrage Myricetin SHV-1.

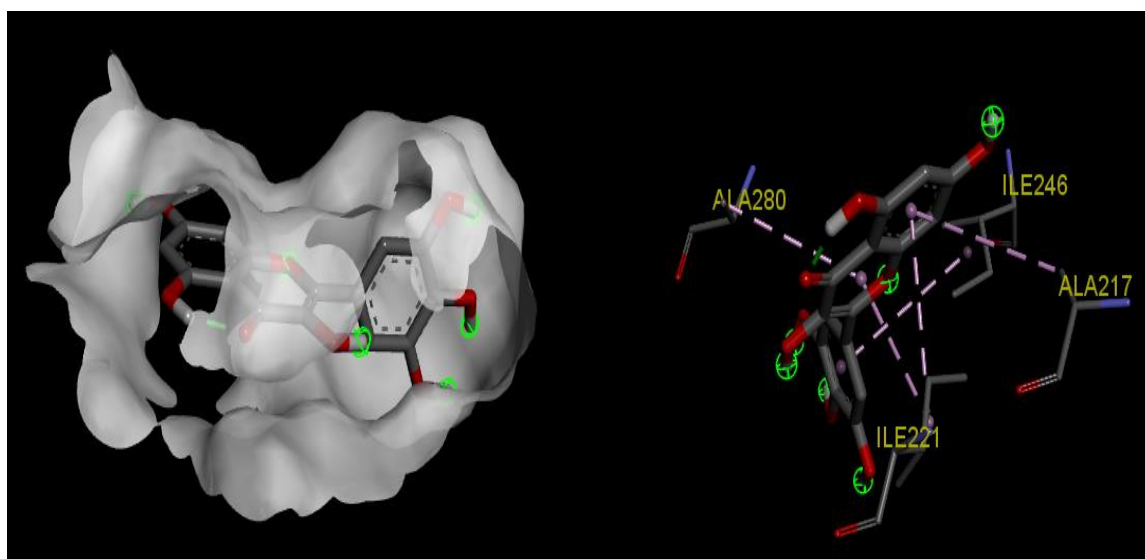


Figure 51 : Représentation 2D et 3D du positionnement du myricetin dans le site actif de SHV-1 Bêta-Lactamase.

On observe une interaction hydrophobiques assurant la stabilité du complexe Myricetin SHV-1 : 4 liaison pi-alkyl avec les résidus Ala280,Ala217 Ile221,Ile246.

Nous avons évalué l'effet inhibiteur de nos 13 molécules sur l'activité de cette enzyme (SHV-1) ,Notre approche d'amarrage moléculaire a été validée par grâce à l'utilisation d'inhibiteur de référence « l'avibactame » , un puissant inhibiteur des beta lactamase à spectre étendu .

Notre analyse d'amarrage moléculaire a montré que la rutine ou le rutoside, est un très bon inhibiteur de l'enzyme, présentait le score d'amarrage le plus faible (-9,9 kcal/mol) interagisse fortement avec le cite actif de l'SHV-1 , il est stabilisé par de nombreuses interactions :hydrogène **Ser70 ,Ser130** et hydrophobiques grâce aux acides aminés suivant **Asn132** ,Asp104 , **Tyr105**(il est connu par ces effets pharmacologique intéressants surtout antioxydante) .

Suivi de l' Apigenine (-8,8 kcal/mol) et de l'acide sinapique (-6,3 kcal/mol), qui sont formés des liaison hydrogène avec le résidu d'acides aminé du site actif de l'SHV-1 qui indiquent une interaction forte et stable avec une bon inhibition . (**l'acide sinapique** Lié avec les acides aminés **Ser130** , **Ala237** , et l' **Apigenine** lié avec Ile279,ALA280 LEU 250,ILE221, **Arg244**).

L'acide Galic, l'acide Caffeique et l'acide P. Coumarique affichent les scores d'amarrage élevé par rapport au molécules précédents (-6,9 - 6,5-6, 5) respectivement qui indiquent une inhibition moyenne entre les ligands et le site actif de l'SHV-1 par rapport aux Rutin.(**l'acide Galic** lié avec les AA Arg198,Ala79 ,Gly147 Ala82,Arg83, ;**l'acide Caffeique** lié avec les AA Ala79,Arg83Val142 ,Phe151, Val142,Gly147,et .l'acide.**P.Coumarique**.lié.avec :Asn276,Ala280 ,Leu250,Ile221,Ile 246 ,Ala248 .

Tous les composés sélectionnés : kaempférol, Quercetine ,l'acide synirique, catechin, Eugenol, acide ferrulique et le myricétine ont montré aucune interaction de liaison hydrogène n'a été observée entre ces molécules et l'SHV beta lactamase , on observe des interactions hydrophobiques (Pi-alkyl, alkyl, Pi-Sigma, Pi Pi stacked) assurant la stabilité des complexe ligand- protéine ce qui nous à permet de classés parmi les molécules à faible inhibition (**kaempférol** lié avec les AA Ala280, Ile279, Ala248, Leu250, Ile246 ,Ile221 ; **Quercetine** lié avec Ala280,Ile279,Ile246,Ala248,Leu250, Ile221 , Gly283 ; **l'acide synirique** lié avec **Val224**,Ala248,Ile221 ,Ile246,ALA280 ; **catechin** lié

avec Ile279,Ala280, Ile221, Ile246, Leu250,Ala248 ; **Eugenol** lié avec Ala82,Arg83 ,Ala79, , Ala86 , Phe151 ; **acide ferrulique** lié avec Ala248,Ile246 , Ala248,Ile246, Ile212 , Asn276 , **myricétine** lié avec Ala280,Ala217 Ile221,Ile246).

Nos résultats obtenus de l'étude complémentaires de docking moléculaire ont confirmé l'étude in vitro faite par Demetrio L. Valle Jr et al (2015) : la plante *P. betle* a une abondance de flavonoïdes, de tanins et d'alcaloïdes. ce qui lui donne une grande valeur potentielle contre les bactéries Gram-négatives et Gram-positives multirésistantes. Les résultats montrent que la meilleure molécule qui possède une excellente activité inhibitrice contre l'SHV bêta-lactamase est la Rutin.

• **Analyse de similarité médicamenteuse:**

Pour déterminer l'effet d'une substance active après son administration dans le corps humain, il est essentiel de reconnaître leur absorption, métabolisme, excrétion et distribution (ADME), également appelées propriétés pharmacocinétiques du médicament , Cinq caractéristiques biochimiques ont une grande influence sur les propriétés ADME du médicament, ce qu'on appelle la règle des cinq de Lipinski, qui décrit la relation entre les propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques. Lipinski définit les médicaments comme des composés qui ont des propriétés ADME et des propriétés de toxicité suffisamment acceptables pour survivre à l'achèvement des essais cliniques humains de phase I.

Le Tableau ci-dessous montre que la molécule Rutin ne répond pas aux règles de Lipinski et de Veber, ce qui indique que ce composé peut être toxique et par conséquent pourrait engendrer des problèmes donc nous pouvons pas le considérer comme un nouveau inhibiteur.

Propriétés	Rutin
Score	-9,9 Kcal/mol
Formule	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆
Masse M	610,52 g/mol
Solubilité dans l'eau	Soluble
Règle de Lipinski	Non (3 violation : MW > 500 ; N or O > 10 ; NH or H > 5)
Règle de verber	Non (1infraction > 140)
TPSA Å ²	269,43 Å ²

Tableau22 : Le profil ADME relative de la molécule Rutin obtenus à partir de serveur swissADME.

Conclusion

La recherche de nouveaux agents antibactériens à partir d'une source naturelle est devenue une entreprise très importante, compte tenu des niveaux croissants de résistance aux antibiotiques. L'un des efforts de cette recherche est axé sur l'utilisation des plantes médicinales qui sont largement disponibles. La médecine traditionnelle est pratiquée dans le monde entier, y compris en Indonésie, depuis des siècles.

Dans le cadre du développement de nouveaux inhibiteurs contre les bactéries résistantes à la bêta-lactamine par BLSE, les travaux effectués dans cette mémoire nous ont permis de définir l'objectif de la recherche d'inhibiteurs de bêta-lactamase de type SHV-1.

Les méthodes de diffusion en puits d'agar ont été utilisées pour estimer le potentiel antimicrobien des extraits des deux plantes *Artemisia campestris* et *Artemisia herba alba*. Sur les 7 souches cliniques multirésistantes et productrices de bêta-lactamase à spectre étendu (BLSE). Les tests de sensibilité antimicrobienne ont montré qu'aucune activité n'a été observée sur les souches de *3 klebsiella pneumoniae*, et *Pseudomonas aeruginosa* ni une activité antibiologique, alors qu'on a remarqué une activité inhibitrice moyenne chez les deux extraits méthanoliques des deux plantes contre *Bacillus cereus*, *staphylococcus aureus*, *micrococcus luteus*.

En ce qui concerne la partie *in silico*, nos résultats obtenus confirment l'étude *in vitro* faite par Demetrio L. Valle Jr et al (2015), les résultats de docking moléculaire, ont démontré que la molécule « Rutin » isolée à partir de la plante P. betle possède une excellente activité inhibitrice contre l'SHV bêta-lactamase.

Enfin, l'application de la règle de Lipinski nous renseigne négativement sur les propriétés ADME de ce composé qui ne se présente pas comme un nouvel inhibiteur puissant de la Bêta-Lactamase.

Références Bibliographiques

- 1). **El Fertas-Aissani R., Messai Y., Alouache S., Bakour R. 2012.** Virulence profiles and antibiotic susceptibility patterns of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different clinical specimens. PATBIO-3048; No. of Pages 8.
- 2). **Chinmay Sen . November 2015 .** Bioleaching of Gold: An alternative green mining technology for 21st century .November 2015, Volume 3 Issue 2 ,page 37.
- 3). **Le Minor L and Véron M. 1989.** Bactériologie médicale, 2ème édition , Flammarion Médecine-Sciences, Paris.**2:428-432.**
- 4). **Podschun R, Ullmann U.** *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. Clin Microbiol Rev 1998;11:589–603.
- 5). **Carpenter, J. L. 1990.** *Klebsiella* pulmonary infections: occurrence at one medical center and review. Rev.Infect.Dis. **12:672-682.**
- 6). **Tsai FC, Huang YT, Chang LY, Wang JT.** Phylogenetic liver abscess as endemic disease, Taiwan. Emerg Infect Dis 2008;14:1592–600.
- 7). **Wiskur BJ, Hunt JJ, Callegan MC.** Hypermucoviscosity as a virulence factor in experimental *Klebsiella pneumoniae* endophthalmitis. Invest Ophthalmol Vis Sci 2008;49:4931–8
- 8) **Mohammed Frikh, A. Maleb, I. Nyaledome Ablavi, M. Elouennass, A.Lemouer.**(2012) Etude épidémiologique des infections à *Pseudomonas aeruginosa*, Journal Marocain des Sciences Médicales, Vol. 21, No 2 ,page N° 176/95
- 9) **Cavallo, J.-D., & Mérens, A. (2008).** *Pseudomonas aeruginosa* et bêta-lactamines à l'heure de l'Europe. Pathologie Biologie, 56(7-8), 435–438. doi:10.1016/j.patbio.2008.07.028
- 10) **SOLBI Soukaina ,(2013)EFFET DU REPIQUAGE DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA SUR LES CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES, BIOCHIMIQUES ET SENSIBILITÉ AUX ANTIBIOTIQUES, Doctorat,116**
- 11) **.G.Lilburn, M.George, A.Garrity julia, Bell and Timothy(2004).** Taxonomic outline of the prokaryotes bergey's manuel of systematic bactériology,second edition.
- 12) **Thierry Naas, Saoussen Oueslati, Rémy A. Bonnin, Maria Laura Dabos, Agustin Zavala, Laurent Dortet, Pascal Retailleau & Bogdan I. Iorga (2017)** Beta-lactamase database (BLDB) – structure and function, Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 32:1, 917-919

13) **-Pitié-Salpêtrière,Wladimir,David Trystram** : 18 février 2003, Résistances aux β -lactamines Service de Bactériologie-Hygiène

14) Barir O et Ghilani M. « Le Profil de résistance aux B-lactamines des souches de *Pseudomonas aeruginosa* d'origine Hospitalière » : Biochimie et biologie moléculaire, Biskra: Université Mohamed khider-Biskra.2011.

15) <http://www.bioquell.fr/technology/Microbiologie/pseudomonas-aeruginosa/>

16) **Françoise. V, Pharm.Sc, Paul .T, Dr. Méd.** (2008). Pharmacologie et Pharmacothérapie Anti-infectieuse. (Degré et type de Thèse), Université, Place Published. (Numéro de Document) : Nombre de Pages.

17) **Vidal ,r.(2020),BIEN UTILISER LES BÊTA-LACTAMINES , L'INTELLIGENCE MÉDICALE AU SERVICE DU SOIN**

18) **Vincent Cattoir** Service de Bactériologie-Virologie-Hygiène, CHU Mondor, AP-HP, LES NOUVELLES BETA-LACTAMASES A SPECTRE ETENDU, Faculté de Médecine de Créteil, Université Paris XII, Créteil, France Service de Bactériologie-Virologie, Unité INSERM U 914

19) **Bradford PA.**(2001) Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. Clin Microbiol Rev 2001;14:933-51

20) **BOUSSOUALIM NAOUEL** ; Caractérisation biochimique d'une β -lactamase isolée d'une souche d'E. coli résistante à l'acide clavulanique. Etude des activités de certains flavonoïdes ; thèse de MAGISTER ; UNIVERSITE DE FARHAT ABBAS –SETIF

21) **BOUSSOUALIM NAOUEL** ; Caractérisation biochimique d'une β -lactamase isolée d'une souche d'E. coli résistante à l'acide clavulanique. Etude des activités de certains flavonoïdes ; thèse de MAGISTER ; UNIVERSITE DE FARHAT ABBAS –SETIF ;

22) **Essack, S. A.** (2001). The Development of β -lactam antibiotics in response to the evolution of β Lactamases. Pharmaceut. Res., 18(10): 1391-1399.

23) **Françoise. V, Pharm.Sc, Paul .T, Dr. Méd.** (2008). Pharmacologie et Pharmacothérapie Anti-infectieuse. (Degré et type de Thèse), Université, Place Published. (Numéro de Document) : Nombre de Pages.

24) **M. Wolff, M.-L. Joly-Guillou , O. Pajot.(2019)** · Service de Réanimation Médicale et des Maladies Infectieuses, Hôpital Bichat-Claude Bernard, AP-HP, Université Paris 7, 46,

25) **P. Boyer, F. Jehl,(2019)** Laboratoire de bactériologie, Plateau technique de microbiologie, Hôpitaux universitaires de Strasbourg, 1-3, rue Koeberlé,

26) **LESLIE CAVALLIN**,(2019), La prescription de carbapénèmes : enjeu majeur dans la lutte contre l'antibiorésistance ; THÈSE DE DOCTEURAT , UNIVERSITÉ TOULOUSE III PAUL SABATIER FACULTÉ DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

27) **Boucetta, Zeyneb; Bechiche, Hanifa; Merimeche, Aida; Yousfi, K** (2012) : Production des B-lactamases par les bactéries et mode d'action, thèse de doctorat, Université de Jijel Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire

28) **Maja,B.,Andrea,M.,Hujer,Robert,A.Bonomo.**, (2006). What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. *ELSERIEV*, 9 (142–156)

29) **H. Rodriguez-Villalobos , M.-J. Struelens** ;(2013), Résistance bactérienne par β -lactamases à spectre étendu : implications pour le réanimateur Extended spectrum β -lactamases mediated bacterial resistance: Implications for the intensivist, *ELSERIEV*, 205–213

30). **Sougakoff W , Trystram D** 2003.Résistances aux β -lactamines ; Service de Bactériologie-Hygiène -Pitié-Salpêtrière.Université Pierre et Marie Curie. 78p

31) **Zineb belbel.2013**. évaluation de la résistance aux antibiotiques des souches de klebsiella pneumoniae isolées dans les hôpitaux de la ville d'annaba, Badji Mokhtar University, Annaba, 162pages.

32) **McGowan JE, Jr**. Resistance in nonfermenting gram-negative bacteria: multidrug resistance to the maximum. *Am J Infect Control*. 2006 Jun;34 (5 Suppl 1):S29-37; discussion S64-73.

33) **Poole K**. Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect*. 2004 Jan;10(1):12-26.

34) **Masuda N, Sakagawa E, Ohya S, Gotoh N, Tsujimoto H, Nishino T**. Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-oprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000 Dec;44(12):3322-7.

35) Wladimir ,S., David, T., 18 février 2003.Résistances aux β -lactamines. Service de Bactériologie-Hygiène -Pitié-Salpêtrière. 25Chapitre 14

36) **LAHLOU, A, SEKHSOKH,Y ,LKASSMI,H**(N°7 Novembre-Décembre 2007), Emergence d'isolats cliniques de *Pseudomonas aeruginosa* producteurs de bêta-lactamases à spectre étendu en milieu hospitalier, *LES TECHNOLOGIES DE LABORATOIRE*,

37). **Rhimi-Mahjoubi, F., Bernier, M., Arlet, G., Ben Jemaa, Z., Jouve, P., Hammami, A., & Philippon, A.** (2002). Mise en évidence de la céphalosporinase plasmidique ACC-1

dans différentes entérobactéries (*Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella*) isolées dans un hôpital tunisien (Sfax 1997–2000). *Pathologie Biologie*, 50(1), 7–11.

38) **Mourad,B.2011**. Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'*Artemisia campestris* L.(Magister), Université Ferhat Abbas, Sétif .99pages.

39) **Ozenda P. (1991)**. flore et végétation du sahara(3edition). Paris. CNRS .700pages.

40) **Diba,I., El Alaoui-Farish,F.(2019)**. *Artemisia campestris* L.: review on taxonomical aspects, cytogeography, biological activities and bioactive compounds. *Biomedicine & Pharmacotherapy*.109. 1884-1906 Pages.

41) **DIB , I.(2017)** Effets vasorelaxants et antihypertenseurs et analyse phytochimique de *Artemisia campestris* L. du Maroc Oriental(doctorat), Université Mohamed Premier Faculté des Sciences ,Oujda.(419/17).241pages.

42) **Nobis, M., Ebel, A.L.,et al .(2014)**. Contribution to the flora of Asian and European countries: new national and regional vascular plant records, 2. *Acta Bot. Gall.* 161(2), 209-221.

43) **Salinas, M.J., Guirado, J., (2002)**. Riparian plant restoration in summer-dry riverbeds of Southeastern Spain. *Restor. Ecol.* 10(4), 695-702.

44) **Noumi, Z., Ouled Dhaou, S., Derbel, S., Chaieb, M., 2010**. The status of Asteraceae in the arid and saharian flora of North African region: case of Tunisia. *Pak. J. Bot.* 42(3), 1417-1422.

45) **Geeson,N.A.,Brandt,C.J., Thornes, J.B., (2003)**. Mediterranean Desertification: a Mosaic of Processes and Responses. John Wiley & Sons, LTD, West Sussex.

46) **Akrout, A., El Jani,H., Amouri ,S., Neffati,M.(2010)**. screening of antiradical and antibacterial activities of essential oils of *artemisia campestris* l., *artemisia herba alba* asso, & *thymus capitatus* hoff. et link. growing wild in the southern of tunisia.Recent Research in Science and Technology, 2(1): 29–39pages.

47)**Benarba, B., 2016**. Medicinal plants used by traditional healers from South-West Algeria: Anethnobotanical study. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology* 5(4), 320-330.

48) **Benderradji, L., Rebbas, K., Ghadbane, M., Bounar, R., Brini, F., Bouzerzour, H., (2014)**. Ethnobotanical study of medicinal plants in Djebel messaad region (M'sila, Algeria). *Global Journal of Research on Medicinal Plants & Indigenous Medicine* 3(12), 445-459.

49) **Boudjelal,A.,Henchiri,C., Sari, M.,et al. (2013)**.Herbalists and wild medicinal plants in M'Sila (North Algeria): An ethnopharmacology survey.*J. Ethnopharmacol.* 148(2), 395-402.

- 50) **Chermat, S., Gharzouli, R.(2015)**. Ethnobotanical Study of Medicinal Flora in the North East of Algeria-An Empirical Knowledge in Djebel Zdimm (Setif). *Journal of Materials Science and Engineering* 5(1-2), 50-59.
- 51) **Hamliche, V., Maiza, K.(2006)**. Traditional medicine in Central Sahara: pharmacopoeia of Tassili N'ajjer. *J. Ethnopharmacol.* 105(3), 358-367.
- 52) **Sarri, M., Mouyet, F., Benziane, M., Cheriet, A . (2014)**. Traditional use of medicinal plants in acity at steppic character (M'sila, Algeria). *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research* 2(2), 31-35.
- 53) **Bammou, M., Daoudi, A., Sellam, K., El Rhaffari, L., Ibijbjen, J., Nassiri, L.(2015)**. Étude Ethnobotanique des Astéracées dans la Région Meknès-Tafilalet (Maroc)[Ethnobotanical Survey of Asteraceae Family used in Meknes-Tafilalet Region (Morocco)]. *Int. J. Innov. Appl. Stud.* 13(4), 789-815.
- 54) **Bnouham, M., Mekhfi, H., Legssyer, A., Ziyat, A. (2002)**. Ethnopharmacology forum medicinal plants used in the treatment of diabetes in Morocco. *Int. J. of Diabetes Metab.* 10, 33-50.
- 55) **El Hassani, M., Douiri, E.M., Bammi, J., Zidane, L., Badoc, A., Douira, A.(2013)**. Plantes médicinales de la Moyenne Moulouya (Nord-Est du Maroc). *Ethnopharmacologia* 50, 39-53.
- 56) **Fakchich, J., Elachouri, M., (2014)**. Ethnobotanical survey of medicinal plants used by people in Oriental Morocco to manage various ailments. *J. Ethnopharmacol.* 154(1), 76-87.
- 57) **Ben Sassi, A., Harzallah-Skhiri, F., Aouni, M.(2007)**. Investigation of some medicinal plants from Tunisia for antimicrobial activities. *Pharm. Biol.* 45(5), 421-428.
- 58) **Leporatti, M.L., Ghedira, K.(2009)**. Comparative analysis of medicinal plants used in traditional medicine in Italy and Tunisia. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* 5(31), 1-8.
- 59) **Tlili, N., Elfalleh, W., Hannachi, H., Yahia, Y., Khaldi, A., Ferchichi, A., Nasri, N.(2013)**. Screening of natural antioxidants from selected medicinal plants. *Int. J. Food Prop.* 16(5), 1117-1126.
- 60) **Akkari, H., Rtibi, K., B'chir, F., Rekik, M., Darghouth, M.A., Gharbi, M., 2014**. In vitro evidence that the pastoral *Artemisia campestris* species exerts an anthelmintic effect on *Haemonchus contortus* from sheep. *Vet. Res. Commun.* 38(3), 249-255.
- 61) **Dagnon, S., Ivanov, I., Bojilov, D., Docheva, M., Statkova, S., 2013**. Evaluation of the main polyphenolic compounds in aromatic plants of Asteraceae and Solanaceae families of Bulgarian origin. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 1(6), 76-84.

62) **Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Vidal, N., Lesgards, J., Stocker, P., 2007.** Screening of some Algerian medicinal plants for the phenolic compounds and their antioxidant activity. *Eur. Food Res. Technol.* 224(6), 801-809.

63) **El-Ghazouly, M.G., Omar, A.A., 1984.** Flavonoid constituents of *Artemisia campestris*

Fitoterapia 55(2), 115–116.

64) **Karabegović, I., Nikolova, M., Veličković, D., Stojičević, S., Veljković, V., Lazić, M., 2011.** Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of methanolic extracts of the *Artemisia* sp. recovered by different extraction techniques. *Chin. J. Chem. Eng.* 19(3), 504-511.

65) **Megdiche-Ksouri, W., Trabelsi, N., Mkadmini, K., Bourgou, S., Noumi, A., Snoussi, M., Barbria, R., Tebourbi, O., Ksouri, R., 2015.** *Artemisia campestris* phenolic compounds have antioxidant and antimicrobial activity. *Ind. Crops Prod.* 63, 104-113.

66) **Sebai, H., Jabri, M.-A., Souli, A., Hosni, K., Selmi, S., Tounsi, H., Tebourbi, O., Boubaker, S., El-Benna, J., Sakly, M., 2014.** Protective effect of *Artemisia campestris* extract against aspirin-induced gastric lesions and oxidative stress in rat. *RSC Adv.* 4(91), 49831-49841.

67) **Megdiche-Ksouri, W., Trabelsi, N., Mkadmini, K., Bourgou, S., Noumi, A., Snoussi, M., Barbria, R., Tebourbi, O., Ksouri, R., 2015.** *Artemisia campestris* phenolic compounds have antioxidant and antimicrobial activity. *Ind. Crops Prod.* 63, 104-113.

68) **Cseke, L., Kirakosyan, A., Kaufman, P., Warber, S., Duke, J., Brielmann, H., (2006).** *Natural Products from Plants.* 2^{ème} Ed, the Academic Division of Informa, P 10-19

69) **Tharib, S. M., Gnan, S. O., & Veitch, G. B. A. (1983).** Antimicrobial Activity of Compounds from *Artemisia campestris*. *Journal of Food Protection*, 46(3), 185–187.

70) **Naili, M.B., Alghazeer, R.O., Saleh, N.A., Al-Najjar, A.Y., 2010.** Evaluation of antibacterial and antioxidant activities of *Artemisia campestris* (Astraceae) and *Ziziphus lotus* (Rhamnaceae). *Arab. J. Chem.* 3(2), 79-84.

71) **Messai L, (2011).** Etude phytochimique d'une plante médicinale de l'est algérien (*Artemisia herba Alba*). Thèse de doctorat en sciences. Université Mentouri Constantine

72) **Boudjelal A. (2013).** Extraction, identification et détermination des activités biologiques de quelques extraits actifs de plantes spontanées (*Ajugaiva*, *Artemisia herba Alba* et *Marrubi umvulgare*) de la région de M'Sila, Algérie. Thèse de doctorat : Biochimie Appliquée. Université Badji Mokhtar. Annaba. 61p. d from the district of Biskra (Algeria). *Phytothérapie.* 8(5) : 277-281.

73) **YACHEUR Boumediene.** (2016). Etude Phytochimique Et Activité antioxydante d'Artemisia Herba Alba Asso et Artemisia campestris L. (Master), Université ABOU BEKR BELKAÏD DE TLEMCEM. 42 pages.

74) **AISSAOUI Ibtissem .BELAID Khaoula ,(2020).** Contribution à l'étude phytochimique de Quatre Plantes médicinales(A. herba Alba Asso, A. campestris L, Juniperus phoenicea et Rosmarinus officinalis) de la région d'oued Souf(master), Université Echahid Hamma Lakdhar- EL OUED

75) **Mounir Tilaoui , Hassan Ait Mouse , Abdeslam Jaafari , and Abdelmajid Zyad,** (2015).Comparative Phytochemical Analysis of Essential Oils from Different Biological Parts of Artemisia herba Alba and Their Cytotoxic Effect on Cancer Cells. PLoS One. 2015; 10(7): e0131799.

76) **J. Albert, Juan F. and Enrique Falcd.**(1990). Artemisia herba-ulba. Terrahedron Vol. 46. pp. 1941.7950.

77) **BOUDJELAL Amel,**(2012). Extraction, identification et détermination des activités biologiques de quelques extraits actifs de plantes spontanées (Ajuga iva, Artemisia herba alba et Marrubium vulgare) de la région de M'Sila, Algérie.(doctorat), Annaba Mokhtar Badji Université.60

78) **Tahraoui A., El-Hilaly J., Israël ZH., Lyousi B.** (2007). Enquête ethnopharmacologique des plantes utilisées dans le traitement traditionnel de l'hypertension et du diabète dans le sud-est marocain (province d'Errachidia). J. Ethnopharmacol., 110, 105-117.

79) **Archambaud M.** Les Antibiotiques : mode d'action et mécanisme de résistance. Laboratoire de Bactériologie-Hygiène .CHU Rangueil–Toulouse. 2009. 38p.

80) **Vallée M.** Résistance aux Bêta-Lactamines à large spectre chez les bactéries à Gram négatif : épidémiologie et diagnostic. Mémoire de maîtrise en microbiologie-immunologie, Université LAVAL du Québec, Canada. 2015. 137p.

81) **Houchi S.** Les métallo-Bêta-Lactamases-Recherche de souches bactériennes productricesEssais d'inhibition de l'activité enzymatique relative par trois flavonoïdes commerciaux et deux extraits de Terminalia chebula. Thèse de Magister en Biochimie. Université Ferhat Abbes Sétif 1.Algérie. 2014. 87 p.

82) **Jacoby G. A.**(2009), AmpC β -Lactamases. Clinical Microbiology Reviews, January 2009 vol. 22 N°. 1; 161-182

83) **Protein Data Bank (PDB) Biological Macromolecular Resource** [En ligne] <http://www.rcsb.org/pdb.Consulté>: [21/03/2017].

84) Aurélien, Grosdidier, (2007), Conception d'un logiciel de docking et applications dans la recherche de nouvelles molécules actives. thèse, de doctorat, UNIVERSITÉ «JOSEPH.FOURIER». 90.p

85) **E. H. Mokrani.** Contribution à l'amélioration de l'activité biologique des inhibiteurs de la dipeptidyl-peptidase 4 dans le diabète de type 2 par simulation informatique. Thèse de magister d'université : Technologie des explorations biochimiques. Constantine : Université Mentouri. Constantine. Algérie. 2012. 75p.

86) **Grosdidier A.** Conception d'un logiciel de docking et applications dans la recherche de nouvelles molécules actives. Thèse de doctorat en pharmacie, Grenoble : Université Joseph Fourier. France. 2007.

87) **Mokrani E. H.** Contribution à l'amélioration de l'activité biologique des inhibiteurs de la dipeptidyl-peptidase 4 dans le diabète de type 2 par simulation informatique. Thèse de magister d'université : Technologie des explorations biochimiques. Constantine : Université Mentouri Constantine. Algérie. 2012. 75p.

88) **El Hadji Said K.** Contribution à l'étude de l'inhibition d'enzyme par des Tripodes pyrazoliques par modélisation moléculaire. Thèse de Master d'université de TLEMCEM Faculté des Sciences Département de Chimie. Tlemcen. Algérie. 2016. 50P

89) **PubChem OPEN CHEMISTRY DATA BASE.** PubChem substance, compound and bioassay [En ligne] <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>. Consulté le : [15/02/2017].

90) **DRUGBANK DATA BASE,** version 5.0. Drugs [En ligne] www.drugbank.ca/drugs. Consulté le: [15/02/2017].

91) **DRUGBANK DATA BASE,** version 5.0. Drugs. [En ligne] : redpoll.pharmacy.ualberta.ca/drugbank. Consulté le : [17/02/2017].

92) **DRUGBANK DATA BASE,** version 5.0. Drugs [En ligne] www.rxlist.com. Consulté le : [17/02/2017].

93) **DRUGBANK DATA BASE,** version 5.0. Drugs [En ligne] : www.porphyrifondation.com/drugdatabase/drug-list. Consulté le : [17/02/2017].

94) **Grosdidier A.** Conception d'un logiciel de docking et applications dans la recherche de nouvelles molécules actives. Thèse de doctorat en pharmacie. Grenoble: Université Joseph Fourier. France. 2007. 90 p.

95) **Abedini ,A (2013).** Evaluation biologique et phytochimique des substances naturelles d'Hyptis atrorubens Poit. (Lamiaceae), sélectionnée par un criblage d'extraits de 42 plantes. (doctorat). Lille Nord de France. France. 198pages

96) **Benhamoud A., Boufrah M.** Conception in silico de nouveaux inhibiteurs De la BêtaLactamase de classe C par Docking Moléculaire. Mémoire de master d'Université : Biochimie Moléculaire et Santé. Constantine : Université des Frères Mentouri Constantine-1. Algérie. 2017. 64p.

97) **Joseph GANGOUE PIEBOJI**,(2007), CARACTÉRISATION DES BETA-LACTAMASES ET LEUR INHIBITION PAR LES EXTRAITS DE PLANTES MÉDICINALES, thèse de doctorat, Université de Liège,104

98) **Joseph Gangoué et al** (2009) , The in vitro antimicrobial activity of some traditionally used medicinal plants against beta-lactam resistant bacteria, J Infect Dev Ctries
2009; 3(9):671-680

99) **Stephane Effoel , Amégninou Agban et al** ,(2020), [Study of the antimicrobial potential of Amaranthus spinosus L. (Amaranthaceae) and Tridax procumbens L. (Asteraceae), two leafy vegetables from the maritime region of Togo, Innovative Space of Scientific Research Journals, Vol. 30 No. 1 Jul. 2020, pp. 239-245

100)] SwissADME [En ligne] <http://www.swissadme.ch/>.

101) PreADMET | Prediction of ADME/Tox – Just another BMDRC Sites site [En ligne] <https://preadmet.bmdrc.kr/>.

101) **Leye ,Pa., Traoré ,Mm ., Barboza D3., Bah Md., Ndiaye Pi., Fall M12., Gaye I1., Zbair M1., Diouf E2.**(2019). La résistance bactérienne dans les infections nosocomiales en réanimation à Dakar. Nosocomial bacterial resistance in ICU at Dakar.24(2).40-46

102) **Cardot martin, E., Dumitrescu, O., Lesprit,PH.** La résistance aux antibiotiques. .06/12.2019.[<https://planet-vie.ens.fr/thematiques/microbiologie/bacteriologie/la-resistance-aux-antibiotiques>].

103)**Jehl F, Chomarat M, Tankovic J, Gérard A. (2012).** De l'antibiogramme à la prescription. bioMérieux S.A.160 pages.

104) **Mourad, B., Rachid,B., Sihem,B.**(2014). Antioxidant activity and phenolic content of Artemisia campestris from two regions of algeria. world journal of environmental biosciences.7(2).61-66.

