



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère De l'Enseignement Supérieur et De la Recherche Scientifique



UNIVERSITE ABBES LAGHROUR - KHENCHELA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

MEMOIRE

Présenté pour l'obtention du diplôme de

MASTER ACADEMIQUE

Domaine : **Sciences de la Nature et de la Vie**

Filière : **Biologie**

Option : **Microbiologie appliquée**

Thème :

***Evaluation de l'activité antimicrobienne des
huiles essentielles de « *Pestacia Lentiscus* »***

Présenté par :

M^r HIMEUR Walid

M^{elle} YAKOUB Khadidja

Jury de soutenance :

Président : **M^r FELOUS S** (MAA) Univ. Abbès Laghrou - Khenchela

Encadreur : **M^r RAHAL K** (MAA) Univ. Abbès Laghrou - Khenchela

Examineur : **M^r ABAIDIA A** (MAA) Univ. Abbès Laghrou - Khenchela

2018 - 2019

Remerciements

Je remercie en premier lieu Dieu pour m'avoir donnée la force et la résolution, le courage, la volonté et la force pour accomplir et réaliser ce travail

Je tien a remercie sincèrement mon pomoteur Mr. RAHAL KHALED enseignant à l'Université Abbes Laghrour de Khenchela, pour avoir accepté d'encadrer mon travail, pour tout le soutien, l'aide, l'orientation, ses précieux conseils, ses encouragements et la guidance qu'il m'apportés durant la réalisation de mon mémoire.

Mes très spéciaux remerciements reviennent a ma famille et mes amis pour leurs encouragement et leur compréhension et a tous mes camarades de promotion.

Enfinement, je remercie tous ceux ou celles qui ont contribué de près ou de loin a l'accomplissement de ce mémoire.

A vous tous, un grand Merci.

TABLE DES MATIERES

Liste des tableaux
Liste des figures
Liste des abréviations

INTRODUCTION GENERALE.....1

PARTIE 01 : IN VITRO

Matériels et Méthodes

| | |
|--|-----------|
| I – Matériels..... | 6 |
| I-1 Matériels végétal..... | 6 |
| I-2 Matériels de laboratoire..... | 6 |
| I-3 Les souches bactériennes testées..... | 6 |
| I-4 Les Antibiotiques..... | 7 |
| I-5 Les milieux de culture..... | 7 |
| II - Méthodes..... | 7 |
| II-1 Méthodes Phytochimiques..... | 7 |
| II- 1-1 L'extraction Des Huiles Essentielles..... | 7 |
| II-1-2 Détermination du Rendement D'extraction..... | 8 |
| II-2 Méthodes Microbiologique..... | 9 |
| II-2-1 Repiquage Des Espèces Bactériennes..... | 9 |
| II-2-2 Préparation De L'inoculum..... | 9 |
| II-2- 3 Préparation Des Disques..... | 9 |
| II-2-4 Préparation des milieux de culture..... | 9 |
| II-2-5 Ensemencement et dépôt des disques..... | 10 |
| III- L'activité antibactérienne..... | 10 |
| III-1 Méthode de diffusion sur disques (Aromatogrammes) Et Antibiogramme..... | 11 |
| III- 2 La méthode de micro dilution en milieu liquide..... | 11 |
| III- 3 L'effet antibactérien de l'association des HE avec les antibiotiques..... | 13 |

Résultats et Discussion

| | |
|---|-----------|
| IV- Résultats et discussion..... | 14 |
| IV- 1 Extraction de l'huile essentielle..... | 14 |
| IV- 2 Rendements..... | 14 |
| IV- 3 Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de <i>Pistachia lentiscus</i> | 14 |
| IV- 3- 1 La méthode de diffusion sur disque..... | 14 |
| IV- 3-2 Détermination de la CMI par la méthode de Micro dilution..... | 18 |
| IV- 3-3 Détermination des CMB..... | 19 |
| IV- 3-4 L'effet du test de la combinaison..... | 20 |
| Conclusion..... | 23 |

PARTIE 02 : IN SILICO

Matériels et Méthodes

| | |
|---|-----------|
| I. Matériels | 25 |
| I.1. Microordinateur | 25 |
| I.2. Programmes | 25 |
| I.3. Banques de Données | 26 |
| I.3.1. « PDB » (Protein Data Bank) | 26 |
| I.3.2. « Pubchem » | 26 |
| II. Méthodes | 27 |
| II.1. Choix des protéines | 27 |
| II.2. Téléchargements des protéines | 27 |
| II.3. La démarche à suivre | 27 |
| II.3.1. Préparation de la protéine | 28 |
| II.3.2. Préparation la banque de donnée | 28 |
| II.3.3. Docking moléculaire | 28 |

Résultats et Discussion

| | |
|---|-----------|
| III. Résultats et Discussion | 30 |
| III.1. La fiabilité du programme MOE | 30 |
| III.1.1. Calcule de la RMSD | 30 |
| III.1.2. L'analyse visuelle..... | 30 |
| III.1.3. Conclusion..... | 31 |
| III.2. Résultats | 31 |
| III.2.1. Etude des interactions « Protéine - Ligand » par MOE | 31 |
| III.3. Discussion | 33 |
| III.4. Les Interactions Electrostatiques | 34 |
| Résultat Complexe 01 : PENICILLIN-BINDING PROTEIN 1a (PBP1a)..... | 34 |
| Résultat Complexe 02 : PEPTIDOGLYCAN GLYCOSYLTRANSFERAS | 35 |
| III.5. Les interactions Hydrophobe (Lipophilicité) | 36 |
| Résultat Complexe 01 : PENICILLIN-BINDING PROTEIN 1a (PBP1a)..... | 36 |
| Résultat Complexe 02 : PEPTIDOGLYCAN GLYCOSYLTRANSFERAS..... | 37 |
| Discussion..... | 38 |
| III.6 .Interactions ligands | 39 |
| Conclusion..... | 43 |
| IV. Conclusion finale <i>in silico</i> | 44 |

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEX

RESUMES

Liste des tableaux

| | |
|---|-------|
| <u>Tableau 01:</u> Taxonomie de <i>Pistacia lentiscus</i> | 2 |
| <u>Tableau 02:</u> Résultats de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de <i>Pistachia lentiscus</i> exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition en mm..... | 14 |
| <u>Tableau 03:</u> Résultats de l'antibiogramme exprimés par le diamètre de la zone D'inhibition en mm..... | 17 |
| <u>Tableau 04:</u> Valeurs des CMI de l'huile Essentielles de <i>Pistachia lentiscus</i> | 18 |
| <u>Tableau 05:</u> Concentrations minimales bactéricide (CMB) de l'huile Essentielle de <i>Pistachia lentiscus</i> | 19 |
| <u>Tableau 06:</u> Les résultats du test de la combinaison des huiles essentielles Avec les antibiotiques | 21 |
| <u>Tableau 07:</u> Les données cristallographique pour les deux protéines..... | 27 |
| <u>Tableau 08:</u> Valeurs de RMSD avec leur score..... | 30 |
| <u>Tableau 09:</u> | 31 |
| Figure a: Complexe 1(Penicillin-binding protein + MES | |
| Figure b: Complexe 2(Peptidoglycan glycosyltrasferas + EPE | |
| <u>Tableau 10 :</u> Le bilan énergétique des 2 complexes (Kcal/mol)..... | 32 |
| <u>Tableau 11 :</u> Les liaisons d'interactions des 2 complexes..... | 42 |
| <u>Tableau 12 :</u> Les structures des composés téléchargé sur PubChem..... | ANNEX |

Liste des figures

| | |
|---|----|
| Figure 01 : les Galles et Feuilles de <i>Pistachia lentiscus</i> | 6 |
| Figure 02 : Dispositif d'extraction Clevenger..... | 8 |
| Figure 03 : La technique de préparation des disques..... | 9 |
| Figure 04 : Test de l'activité antibactérienne de <i>Pistachia lentiscus</i> | 10 |
| Figure 05 : La méthode de micro dilution..... | 11 |
| Figure 06 : La méthode de remplis des puits de microplaque..... | 12 |
| Figure 07 : la sensibilité des Souches testées contre les huiles essentielles des <i>P.lentiscus</i> | 16 |
| Figure 08 : Photos illustrant la sensibilité des souches bactériennes testées vis-à-vis de l'Oxaccilline et Tétracycline..... | 17 |
| Figure 09 : Concentration minimale inhibitrice (CMI)..... | 18 |
| Figure 10 : Résultat de CMB pour <i>E.coli</i> et <i>L. monocytogenes</i> | 20 |
| Figure 11 : Résultats d'effets du test de la combinaison d'huile essentielle avec les antibiotiques pour <i>E.coli</i> et <i>L.monocytogenes</i> | 22 |
| Figure 12 : Application MOE Windows..... | 25 |
| Figure 13 : Page d'accueil de PDB (Protein Data Bank)..... | 26 |
| Figure 14 : page d'accueil de PubChem..... | 27 |
| Figure 15 : protéine 1 code d'accès 2 (site PDB)..... | 28 |
| Figure 16 : protéine 2 code d'accès 2OQO (site PDB)..... | 28 |
| Figure 17 : Schéma présentatrice le protocole de MOE (Molecular Operating Environment)..... | 29 |
| Figure 18 : Superposition de la géométrie des ligands obtenu par Cristallographie (coloré en rouge) et celle calculée par docking Moléculaire avec MOE (coloré en vert)..... | 31 |
| Figures 19 : Le Docking des 2 complexes..... | 32 |
| Figure 20 : Images de meilleures poses (conformations)..... | 32 |
| Figure 21 : Récepteur de PBP1a..... | 34 |
| Figure 22 : Ligand MES de PBP1a..... | 34 |
| Figure 23 : Récepteur de Hexadecanoic acid..... | 35 |

| | |
|--|----|
| <u>Figure 24</u> : Ligand de Hexadecanoic acid | 35 |
| <u>Figure 25</u> : Récepteur Peptidoglycan glycosyltransferas..... | 35 |
| <u>Figure 26</u> : Ligand EPE de Peptidoglycan glycosyltransferas | 35 |
| <u>Figure 27</u> : Récepteur d'Elemicin..... | 36 |
| <u>Figure 28</u> : Ligand d'Elemicin | 36 |
| <u>Figure 29</u> : Récepteur de PBPa1..... | 37 |
| <u>Figure 30</u> : Ligand MES de PBPa1..... | 37 |
| <u>Figure 31</u> : Récepteur de Hexadecanoic acid | 37 |
| <u>Figure 32</u> : Ligand de Hexadecanoic acid | 37 |
| <u>Figure 33</u> : Récepteur de Peptidoglycan glycosyltransferas..... | 38 |
| <u>Figure 34</u> : Ligand EPE de Peptidoglycan glycosyltransferas | 38 |
| <u>Figure 35</u> : Récepteur d'Elemicin | 38 |
| <u>Figure 36</u> : Ligand d'Elemicin | 38 |
| <u>Figure 37</u> : Diagramme d'interaction du complexe 1 (PBPa1 + MES) | 40 |
| <u>Figure 38</u> : Diagramme d'interaction du complexe 2 (peptidoglycan glycosyltransferas + EPE)..... | 40 |
| <u>Figure 39</u> : Diagramme d'interaction ligand de de meilleur score (hexadecanoic acid) de PBPa1..... | 41 |
| <u>Figure 40</u> : Diagramme d'interaction ligand de meilleur score (Elemicin) de peptidoglycan glycosyltransferas..... | 42 |

Liste des abréviations

AFNOR : Association française de normalisation

ATCC : American Type Culture Collection

BMH : Bouillon Mueller Hinton

CMB : Concentration minimale bactéricide

CMI : Concentration minimale inhibitrice

CMIs : Concentrations minimales inhibitrices

DMSO : Sulfoxyde de diméthyle

MH : Muller Hinton

UFC : Unité Formant Colonie

E. coli : Escherichia coli

L.monocytogenes : Listeria monocytogenes

µl, ml : Microlitre, millilitre

% : Pourcentage

M : masse d'huile essentielle en gramme

m₀ : masse de la matière végétale

Mm : Millimètre

ml : Millilitre

R_{dt} : Rendement en Huile Essentielle

µl : Microlitre

H : Heure

HE_p : Huile essentielle pure

HE : Huile essentielle

CMBs : Concentration Minimale Bactériostatique

CMBc : Concentration Minimale Bactéricide

MOE : Molecular Operating Environment

PDB : Protein Data Bank

PBP1a : Penicillin-Binding Protein 1a

INTRODUCTION

GENERALE

Depuis la nuit des temps, les hommes se sont soignés avec les plantes qu'ils avaient à leur disposition contre les maladies bénignes, rhume ou toux, ou plus sérieuses, telles que la tuberculose ou la malaria (Iserin, 2001) ont servi de pharmacothèque naturelle et pragmatique pour l'homme. Personne ne cherchait à savoir pourquoi ou comment elles agissent, mais c'était un fait incontesté et qui paraissait magique. En effet il est étonnant qu'une feuille, une fleur ou une racine puisse guérir ou tout au moins soulager un état pathologique ou des troubles organiques. (Schauenberg et Paris, 2010)

A travers les siècles, les traditions humaines ont su développer la connaissance et l'utilisation des plantes médicinales pour objectif de vaincre la souffrance et d'améliorer la santé des hommes. En Afrique du Nord, elles constituent une part très importante des ressources génétiques locales à valeurs pastorales, fourragères, alimentaires, aromatiques et médicinales (Amirouche, 2008) l'Algérie est connue par sa diversité en ressources végétales. Parmi les quelles cet arbre spontané qui pousse sur tout le bassin méditerranéen: porte le nom de Pistachier de lentisque (*Pistachia lentiscus*).

Appartenant à la famille des *Anacardiaceae*, cette plante est largement utilisée dans la médecine traditionnelle nom de l'arbre au mastic (Garnier *et al.*, 1961) il se trouve à l'état sauvage, dans les maquis et les garrigues dans tout type de sols, dans l'Algérie subhumide et semi-aride plus précisément dans le bassin du Soummam en association avec le pin d'Alep, le chêne vert et le chêne liège (Belfadel, 2009)

Les espèces les plus importantes dans le monde du genre *Pistachia* sont : *Pistachia atlantica*, *Pistachia chinensis*, *Pistachia lentiscus*, *Pistachia terebinthu*, *Pistachia vera*, *Pistachia integerrima*, *Pistachia palestina* et *Pistachia khinjuk*

Plusieurs espèces endémiques de *Pistachia* colonisent le territoire Algérien (*Pistachia lentiscus*, *Pistachia therebintus* et *Pistachia atlantica*) (Benabderrahmane *et al.*, 2009).

Tableau 01 : Taxonomie de *Pistachia lentiscus* (Boukeloua, 2009)

| Taxonomie | Espèce |
|--------------------|-----------------------------------|
| Règne | <u>Plantae</u> |
| Embranchement | Spermaphytes |
| Sous embranchement | Angiospermes |
| Classe | Dicotylédones |
| Sous classe | Apétale |
| Ordre | <u>Sapindales</u> |
| Famille | Anacardiacees |
| Genre | <u>Pistachia</u> |
| Espèce | <u><i>Pistachia lentiscus</i></u> |

La médecine actuelle remet de plus en plus en honneur les simples plantes médicinales, car l'efficacité des médicaments tels que les antibiotiques décroît, et l'émergence de microorganismes pathogènes multi résistants, due à l'usage abusif et inapproprié des antibiotiques leur effets sont extrêmes, divers, puisqu'ils dépendent de l'antibiotique et du germe étudié.

L'effet de l'antibiotique n'est pas le même sur toutes les bactéries : chaque antibiotique est caractérisé par son spectre d'action, correspondant à l'ensemble des Bactéries habituellement sensible qui peuvent être soit bactéricides, soit bactériostatiques et un antibiotique bactéricides à

une certaine concentration peut s'avérer bactériostatique à concentration plus faible (Singleton, 2005) qui pose actuellement un problème de santé publique particulièrement préoccupant.

Les bactéries peuvent devenir résistantes aux antibiotiques via différents mécanismes (Turkmen *et al.*, 2006). Considéré comme facteur compliquant l'action de ces antibiotiques qui existe 3 modes : la modification de la cible (la cible de l'antibiotique est

Modifiée et l'antibiotique ne peut plus s'y fixer), l'inactivation enzymatique (l'antibiotique est modifié par la production d'une enzyme bactérienne et ne reconnaît plus sa cible), l'imperméabilité, c'est la diminution de la pénétration et l'efflux actif par des pompes plus ou moins spécifiques (Georgantelis *et al.*, 2007)

La résistance d'une bactérie à un antibiotique peut être naturelle ou acquise. Elle est naturelle quand elle existe pour les souches dites sauvages appartenant à l'ensemble des souches d'une espèce bactérienne, elle est toujours transmissible à la descendance (Andreu, 2003), par ailleurs une souche sensible peut acquérir une résistance à un ou plusieurs antibiotique, soit par mutation, soit par divers transferts génétique. (Horvath *et al.*, 2002).

L'activité biologique d'un extrait végétale est liée à sa composition chimique, aux groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, composés terpéniques et cétoniques) et à leur effets synergiques (Dorman, 2000). Cependant, l'évaluation des propriétés phytothérapeutiques comme l'activité antibactérienne, demeure une tâche très utile et l'une des plus intéressantes pistes à explorer

Lorsque les extraits d'herbes ont des composés chimiques capables d'avoir une activité antimicrobienne (Bousbia, 2003). Leurs constituants sont actifs contre une large gamme des bactéries levures et champignons.

Pistachia lentiscus est une plante utilisée, aussi bien en médecine traditionnelle humaine que vétérinaire, sa consommation par les moutons et chèvres diminue le risque des infections par les larves contagieuses (Rogosic *et al.*, 2008; Lizcano *et al.*, 2010). Elles sont également utilisées dans le traitement d'autres maladies telles que l'eczéma, infections buccales, diarrhées, maux de tête, ulcères, maux d'estomac, asthme et problèmes respiratoires (Villar *et al.*, 1987). Toutes les parties de cette plante ont des vertus thérapeutiques, Fruits pour les douleurs dorsales, douleurs d'estomac (Hmimsa, 2004 ; Bensegueni *et al.*, 2007). Les Feuilles pour gastro-intestinaux, diarrhée (Kivçak et Akay, 2005 ; Atmani *et al.*, 2009) et la Résine pour Astringente, Tonique (Boullard, 2001; Belfadel, 2009) Autres travaux :

- **Alimentaire** : le lentisque produit une oléorésine appelée mastic (gomme), consommée dans les traditions comme chewing-gum, additif alimentaire (Dogan *et al.*, 2003). Dans plusieurs pays d'orient et d'Afrique du Nord, on la mélange à de la farine et à de la pâte d'amandes pour faire une sorte de beurre considéré comme aphrodisiaque qui est dilué dans le thé (Rivera-Nuñez et Obón De Castro, 1991).
- **Cosmétique** : fabrication de parfum, adhésif dentaire (Dogan *et al.*, 2003).
- **Industriel** : pour l'éclairage (Bonnier et Douin, 1934), préparation des savons. Une des originalités majeures des végétaux, réside dans leur capacité à produire des substances naturelles très diversifiées, en effet, à côté des métabolites primaires Classiques, ils accumulent fréquemment des métabolites dits secondaires dont la fonction physiologique n'est pas toujours évidente, (Mekkiou, 2005) : les huiles essentielles, composé phénolique ...

Les huiles essentielles est un mélange de composés lipophiles, volatils et souvent liquides, synthétisés et stockés dans certains tissus végétaux spécialisés. Extraites de la plante grâce à des procédés physiques tels l'hydro distillation, l'entraînement à la vapeur ou par expression à froid. Les huiles essentielles sont responsables de l'odeur caractéristique de la plante (Bruneton, 1993) possèdent de nombreuses activités biologiques. En phytothérapie, elles sont utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses .

D'origine bactérienne, et d'origine fongique contre les dermatophytes Cependant, elles possèdent également, des propriétés cytotoxiques qui les rapprochent donc des antiseptiques et désinfectants en tant qu'agents antimicrobiens à large spectre (Bruneton, 1999). L'activité antibactérienne des huiles essentielles a été la plus étudiée. On distingue deux sortes d'effets des huiles essentielles sur ces microorganismes :

- Effet bactéricide (bactéricide) : exerçant une activité létale.
- Effet bactériostatique (bactériostase) : entraînant une inhibition de la croissance (Lakhdar, 2015)

L'huile de Lentisque, est une huile végétative extraite à partir de l'espèce *Pistachia lentiscus* est utilisée dans la médecine traditionnelle pour le traitement des petites blessures, brûlures légères et érythèmes. Ceci, nous a poussé à étudier la composition de cette l'huile en molécules bioactives et leur l'activité antibactérienne. Les différentes propriétés, notamment

antibactérienne des plantes médicinales sont essentiellement dues à leurs composés bioactifs. Ils sont étudiés dans le but de trouver de nouvelles structures modèles pour le développement de médicaments thérapeutiques ou protecteurs (Bossokpi, 2003). La recherche des molécules naturelles aux propriétés antimicrobiennes est d'une grande importance aussi bien dans le domaine médical que dans le domaine de l'industrie alimentaire. (Bousbia, 2003 ; Rayour, 2003; Bouhdid, 2009)

Un antibiotique agit du fait de son affinité pour une cible vitale pour la bactérie. Sa fixation spécifique inhibe le fonctionnement de cette cible qui est en général une enzyme ou structure clé impliquée dans la synthèse de la paroi, les acides nucléiques, des protéines ou de la membrane cytoplasmique (Georgantelis *et al.*, 2007).

Les modes d'action majeurs des antibiotiques incluent : l'interférence avec la synthèse de la paroi cellulaire (β -lactamines), l'inhibition de la synthèse protéique (Turkmen *et al.*, 2006). Les aminosides agissent au niveau du ribosome bactérien et perturbent la synthèse protéique (Joualt, 2012). L'interférence avec la synthèse de l'acide nucléique (les quinolones sont spécifiques à l'ADN bactérien et exercent une activité bactéricide pendant la phase de multiplication et de repos des bactéries) (Davidson, 1997). L'action sur la membrane est aussi un mécanisme antibactérien très répandu, attaque de la paroi bactérienne par l'huile essentielle, provoquant une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires (fuite d'électron et la coagulation du contenu protéique Des cellules), et acidification de l'intérieur de la cellule, bloquant la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure.

Les polymixines induisent l'augmentation de la perméabilité membranaire causant la perte du contenu de la cellule bactérienne tandis que le lipopeptide cyclique daptomycine agit, apparemment, par l'insertion de sa queue lipidique à l'intérieur de la membrane, causant sa dépolarisation et éventuellement la mort bactérienne (Stéphane *et al.*, 1997).

PARTIE 01 :

IN VITRO

Matériels et Methodes

I - Matériel

I -1 Matériels végétal

Notre étude a été menée sur les galles de la plante *Pistachia lentiscus*. La récolte a été en février 2019, Wilaya de Khnechela, pendant la période de floraison. L'identification de l'espèce a été faite par Dr. Rahal Khaled maître de conférences à la faculté des sciences de la nature et de la vie, Université Abbes Laghrour, Khenchela .



Figure 01 : les Galles et Feuilles de *Pistachia lentiscus*

Après la récolte et l'identification, le matériel végétal est nettoyé des impuretés, séché à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 15 jours, puis conservé dans les sachets en papier pour servir à l'extraction de l'huile essentielle.

I -2 Matériels de laboratoire

a- Réactifs

Eau physiologique, Gélose Nutritive GN, Mueller-Hinton MH, les Antibiotiques : tétracycline, oxaciline, Eau de Javel, DMSO (Dimethylsulfoxyde), Mac Farland

b- Instruments et Appareillage

Tubes à essai, Anse de platine, Bec bunsen, Boîtes de pétri, Ecouvillons, Micropipette, Pince, Autoclave 120°C, Etuve électrique à 37°C, Réfrigérateur, Bain Marine, Vortex, disques de 6mm, microplaques, lambeaux, Spectrophotométrie UV-visible, Plaque chauffante.

I - 3 Les souches bactériennes testées

L'activité antibactérienne des huiles essentielles de Pistachier a été évaluée sur deux souches bactériennes provenant de l'American Type Culture Collection (ATCC), de référence :

➤ Les souches bactériennes :

- Gram positif : *Listeria monocytogenes* ATCC 25922
- Gram négatif : *Escherichia coli* ATCC 25922

I - 4 Les Antibiotiques

Deux antibiotiques conventionnels ont été utilisés : oxaciline, tétracycline

I - 5 Les milieux de culture

Les milieux de culture utilisés pour la réalisation des tests antibactériens sont les suivants:

- La gélose nutritive (GN) pour l'isolement des souches bactériennes. Ce milieu peu est préparé selon la méthode suivante : avec une quantité de poudre déshydratée du GN équivalente **14 g** dans un **500 ml** eau distillé
- Le Mueller Hinton c'est le milieu de culture utilisé pour étudier l'activité antibactérienne parce que c'est le milieu le plus employé pour les tests de sensibilité aux agents antibactériens. Le (MHA) pour l'étude de la sensibilité des bactéries aux huiles essentielles et aux antibiotiques par la méthode de diffusion sur disque et (BMH) pour la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB) par la méthode de micro dilution en milieu liquide. Ce milieu peu est préparé selon la méthode suivante : on pèse avec précision une quantité de poudre déshydratée du MH équivalente de MHA **19 g** et MHB **10,5 g** dans un ballon en y ajoutant **1000 ml** d'eau distillée.

Les mélanges des poudres-eau distillée est chauffé sur plaque chauffante avec agitation à l'aide d'un barreau magnétique pendant **20 min** afin d'assurer une bonne Dissolution des cristaux. Le milieu MH est ensuite réparti dans des flacons stériles avant d'être autoclaver pendant **20 min** à **121°C** avec une pression de **1 bar**.

II- Méthodes

II-1 Méthodes Phytochimiques

II- 1-1 L'extraction des huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles a été effectuée par hydro distillation dans un appareil de type Clevenger (Clevenger, 1928). Elle consiste à couper le matériel végétal en parties très fines et soumises à l'hydro distillation en se servant du dispositif d'extraction. L'hydro distillation se base sur le pouvoir que possède la vapeur d'eau à transporter les HE. L'opération consiste à immerger une quantité de la masse végétale dans un grand ballon en verre

pyrex de 1 litre contenant une quantité suffisante d'eau distillée sans remplir complètement le ballon (le contenu du ballon ne doit pas dépasser les deux tiers). Le mélange est porté à ébullition à l'aide d'une plaque chauffante. Les vapeurs chargées de l'huile essentielle passent à travers le réfrigérant où aura lieu la condensation.

Les gouttelettes ainsi récupérées dans une fiole, sont ensuite mises dans une ampoule à décantation, et récupérées en ajoutant du chloroforme (HE se dissout dans le chloroforme). Cette opération est répétée trois fois (séparation liquide). Ensuite on passe le mélange dans le rota vapeur pour obtention des huiles essentielles. L'hydro distillation dure 5 heures. Les huiles essentielles obtenues sont conservées dans des flacons opaques bien scellés à l'abri de la lumière et à une température de 4 à 6 C°.



Figure 02 : Dispositif d'extraction Clevenger

II- 1-2 Détermination du rendement d'extraction

Le rendement est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue et la masse de matière végétale utilisée. Après récupération de l'huile essentielle, le rendement est calculé par la relation suivante :

$$R_{dt} (\%) = m/m_0 \times 100$$

R_{at}: rendement d'huile essentielle (en pourcentage).

m : masse d'huile essentielle récupéré (g).

m₀: prise d'essai de matériel végétale (g) (Afnor, 2000).

II- 2 Méthodes Microbiologique

II-2-1 Repiquage des espèces bactériennes

Les différentes espèces bactériennes ont été repiquées par la méthode des stries, puis Incubée à 37 °C afin d'obtenir des colonies isolées qui vont servir à la préparation de l'inoculum.

II-2-2 Préparation de l'inoculum

A partir d'une culture jeune de 18-24h, des colonies bien isolées et parfaitement identiques sont prélevées, puis déchargées dans 9 ml d'eau physiologique stérile et bien homogénéisée. L'opacité de l'inoculum doit être équivalente à 0,5 Mc Ferland Ou à une densité optique de 0,08 à 0,10 à 625 nm (ce qui correspond à environ 10^8 UFC/ml)

II-2-3 Préparation des disques

Des disques de papier Wattman n°1 de 6 mm de diamètre, (stérilisation à 120°C pendant 20 min par autoclavage)



Figure 03 : La technique de préparation des disques

II-2-4 Préparation des milieux de culture

La gélose de Muller Hinton stérile prête à l'usage a été coulée dans des boîtes de pétrie Stériles de 90 mm de diamètre. L'épaisseur de la gélose est de 2 mm répartie uniformément Dans

les boîtes. Ces dernières doivent être séchées 30 min à une température ambiante du Laboratoire avant leur emploi.

II-2-5 Ensemencement et dépôt des disques

Un écouvillon stérile est imbibé dans la suspension bactérienne puis essoré en le pressant fermement sur la paroi interne du tube afin de décharger au maximum. L'écouvillon est frotté sur la totalité de la surface gélosée, de haut en bas, en stries serrées. L'opération est répétée trois fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois et en le passant sur la périphérie de la gélose (Benzeggouta, 2005). Les disques préparés sont ensuite déposés délicatement à l'aide d'une pince stérile sur la surface des milieux Muller-Hinton préalablement ensemencés par les bactéries -testées, à l'aide d'une micropipette on a déposé 10 µl de chaque huile sur les disques. Les boîtes sont d'abord laissées à une température ambiante pendant 20 min pour assurer une bonne diffusion, puis incubées à 37°C pendant 18 heures.



A : Ensemencement

B: Dépôt du disque

C:Préparation de l'inoculum

Figure 04 : Test de l'activité antibactérienne de *Pistachia lentiscus*

III- L'activité antibactérienne

Ce test est réalisé in- vitro, la technique utilisée est la technique de contact direct qui compte deux méthodes, la méthode des puits (microplaque) et la méthode de diffusion sur disque dite l'aromatogramme et antibiogramme sont utilisées pour évaluer l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Pistachia lentiscus* fractionnée dans le temps.

III- 1 Méthode de diffusion sur disques (Aromatogrammes) et Antibiogramme

L'évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles HE et de séries de Dilutions (1/2 et 1/4 et 1/8 1/16 etc.) dissoute dans le DMSO (Dimethylsulfoxyde) par la méthode de diffusion en milieu solide (la méthode des disques et antibiotiques)

Cette méthode appelée aromatogramme par référence à l'antibiogramme, la seule différence est quel 'antibiotique est remplacé par les huiles essentielles'. Cette méthode consiste à déposer les disques de papier Wattman N° 01 imprégnés d'HE (10µl) et deux antibiotiques conventionnels par boîte à la surface du milieu gélosé, Mueller -Hinton, écouvillonné par une suspension microbienne (*Listeria monocytogenes* et *Escherichia coli*) (5 disques par boîte) ; Celles -ci sont ensuite fermées et laissées diffuser pendant 20 mn sur verre de montre stérile. Après une durée d'incubation de 18 h à 37°C, les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés.

NB : Dans le cas de l'ensemencement de plusieurs boîtes de Pétri il faut recharger L'écouvillon à chaque fois.

III- 2 La méthode de micro dilution en milieu liquide

Cette méthode est utilisée pour rechercher la concentration minimale inhibitrice (CMI), est définie comme la concentration minimale d'huile essentielle dans le bouillon résultant une diminution ou changement dans la croissance de microorganisme.

Les CMI sont déterminées en milieu liquide dans un bouillon MH en utilisant des microplaques de 96 puits. Des dilutions des HES étudiées sont effectuées en raison de 1/2, de telle façon, la suspension bactérienne de charge $1,5 \times 10^8$ UFC/mL est diluée pour obtenir une charge final de $1,5 \times 10^5$ UFC/mL).

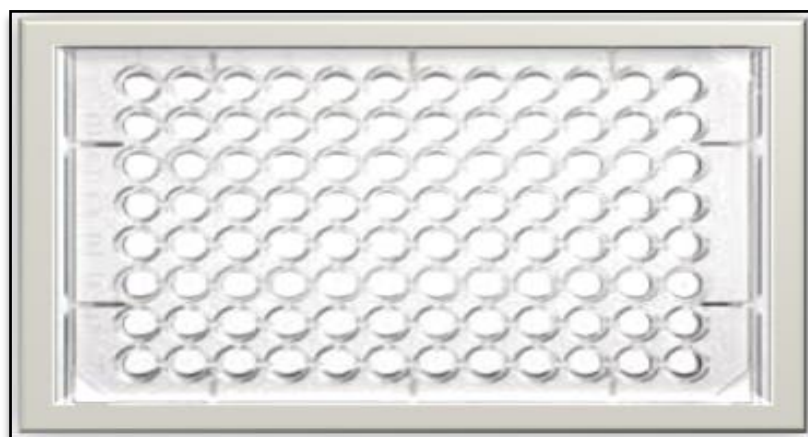


Figure 05: La méthode de micro dilution

Dans chaque puits de microplaque, nous avons introduit 90 μL de bouillon Mueller-Hinton. Ensuite 100 μL de la dilution d'HE dans première puits puis agité et ajouté Dans les autres puits avant de mélangées, 10 μL de suspension bactériennes de $1,5 \times 10^5$ UFC/mL sont ensuite ajoutés dans chaque puits de la microplaque.

Les microplaques sont scellées et placées dans un incubateur à 37°C pendant 24 heures. La lecture se fait par observation de la microplaque à l'œil nue. La CMI du composé testé est déduite à partir du premier puits de la gamme ne présentant pas de dépôt ou trouble.

La CMB testé a été déterminée comme étant la plus faible concentration a laquelle aucune croissance visible du micro-organisme n'avait eu lieu.

Pour estimer l'activité létale d'huiles essentielles, les microorganismes sont transférés du bouillon liquide où aucune croissance n'a été observée (sur microplaque), et incubés dans des tubes à essai qui contient 9ml d'un nouveau milieu de bouillon MH.

La plus faible concentration d'huile essentielle entraînant l'inhibition de la croissance totale est reconnue comme la concentration minimale mortelle, CMB pour les bactéries (Concentration minimale bactéricide)

L'activité antibactérienne des composés pris isolément est estimée par le rapport CMB/CMI; lorsque le rapport CMB/CMI d'une substance antimicrobienne est inférieur ou égal à quatre (≤ 4) cette dernière est qualifiée de substance bactéricide, cependant si ce rapport est supérieur à quatre (> 4), alors elle est dite bactériostatique (Traoré *et al.*, 2012).



Figure 06 : La méthode de remplis des puits de microplaque

III- 3 L'effet antibactérien de l'association des HE avec les antibiotiques

L'évaluation du pouvoir antibactérien de l'association des HE avec les antibiotiques a été réalisée par la méthode de diffusion sur disques en deux étapes différentes. Dans la première étape, nous avons évalué l'activité antibactérienne des déluions des huiles essentielles allant de 1/2 jusqu'à 1/16 dans le but de déterminer la concentration qui a donné la zone d'inhibition la plus petite.

La seconde étape est d'évaluer l'activité antibactérienne de l'huile essentielle en association avec l'antibiotique. Les disques des antibiotiques sont imprégnés par 10 µl de l'huile essentielle. Après la période d'incubation, les zones d'inhibition de croissance ont été mesurées.

Les données de l'activité antibactérienne des huiles essentielles et les antibiotiques seules et en combinaison ont été soumises à une analyse statistique à un seul facteur. La combinaison d'HE avec ATB peut donner un effet synergique, additif, antagoniste

L'effet antibactérien des combinaisons entre les HE et les AB a été évalué par la formule suivante :

$$EC = [(E_{he} - D) + (E_{ab} - D)] / (E_{he+ab} - D).$$

EC : Effet antibactérien de l'association des huiles essentielles avec les antibiotiques.

E_{he} : Effet antibactérien des huiles essentielles.

E_{ab} : Effet de l'antibiotique.

D : Diamètre du disque égale 6 mm.

Les interactions peuvent être classées comme suite :

- **Addition** : l'effet de l'association est égal à la somme des effets d'antibiotique et huiles pris isolément.

- **Synergie** : l'effet est supérieur à la somme des effets d'antibiotique et huiles pris isolément.

- **Antagonisme** : l'activité est inférieure à la somme des effets d'antibiotique

Résultats et Discussion

IV- Résultats et Discussion

IV- 1 Extraction de l'huile essentielle

L'huile essentielle de *Pistachia lentiscus* obtenues par hydro distillation sont des liquides visqueux, limpides, et à une odeur forte caractéristique du genévrier, avec une couleur dégradée allant d'une huile transparente blanchâtre.

IV- 2 Rendements

Le rendement moyen en huile essentielle a été calculé selon la norme (AFNOR, 2000), en fonction de la matière végétale sèche de la plante. Le rendement en huile essentielle des galles de *Pistachia lentiscus* a fourni un taux de **3,25 %** comparaison autre organes

IV- 3 Etude de l'Activité Antibactérienne des huiles essentielles de *Pistachia lentiscus*

L'activité antibactérienne des huiles essentielles de *P. lentiscus* a été évaluée vis -à-vis de deux souches bactériennes souche à Gram positif et à Gram négatif en utilisant deux méthodes différentes à savoir : la méthode de diffusion sur disque et la méthode de micro dilution sur plaque.

IV- 3- 1 La méthode de diffusion sur disque

A- L'aromatogramme

L'activité antimicrobienne des HEs a été testée par la méthode de l'aromatogramme. La sensibilité des souches se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour des disques, d'un diamètre variable selon la souche nous a permis d'obtenir les résultats présentés dans le (Tableau 02)

Tableau 02 : Résultats de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Pistachia lentiscus* exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition en mm

| | Diamètres des zones d'inhibition de l'HE (mm) | | | | |
|------------------------|---|------|------|------|------|
| | Pure | 1/2 | 1/4 | 1/8 | 1/16 |
| <i>E.coli</i> | 17 | 8,33 | 8,33 | 7,33 | 10 |
| <i>L.monocytogenes</i> | 00 | 00 | 00 | 00 | 00 |

D'après les résultats de l'évaluation de l'activité antimicrobienne par l'HE de Pistachier lentisque on déduit que l'huile essentielle est jugée modérément active contre *Escherichia coli*, avec un diamètre d'inhibition moins de 18 mm .Seule la souche de *Listeria monocytogenes* n'a aucune activité antimicrobiennes cela peut justifier que la composition de notre huile essentielle ne possède pas les principes actifs (composés) qui présentent une activité sur ce type des souches microbiennes.

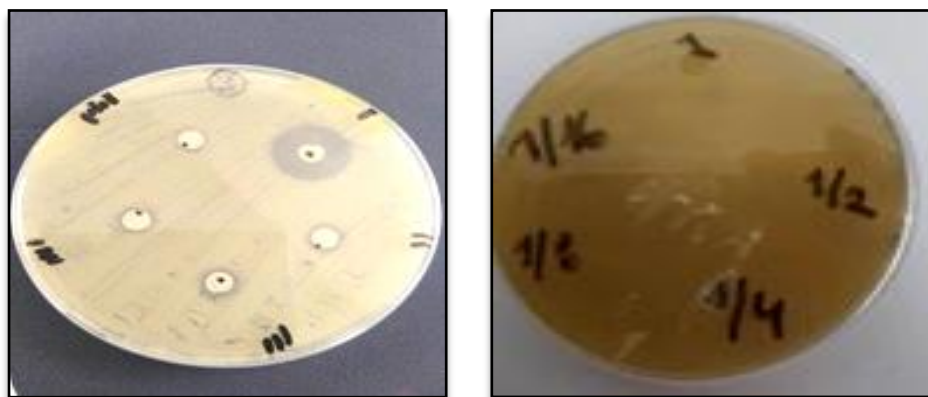
Les résultats de l'aromatogramme nous ont montré que les souches bactérienne Gram positif sont résistantes aux huiles essentielles de toutes les dilutions cela peut justifier que la composition de notre huile essentielle ne possède aucun pouvoir sur ce type des souches microbiennes. Cependant, les bactéries Gram négatif sont sensibles aux huiles essentielles.

(Hammer *et al.*, 1999, 2002 ; Souza *et al.*, 2006a ; Derwich *et al.*, 2010 ; Bari *et al.*, 2010) ont confirmé la grande résistante des bactéries G- par rapport aux G+, ce qui n'accorde pas avec nos résultats, ce constat peut être dû à l'action de certains composés volatiles de l'huile essentielle (Dorman *et al.*,2000).

En effet, l'organisation structurale de la paroi cellulaire des bactéries à Gram positif est moins complexe que celle des bactéries à Gram négatif. Cette différence structurale la rend moins sensible à l'action des huiles essentielles (Kalemba et Kunicka, 2003). L'activité des agents antimicrobiens sur les bactéries Gram positif peut s'expliquer par l'accessibilité Directe de ces molécules aux peptidoglycanes constituant la paroi, provoquant ainsi la dissolution complète de cette dernière. Les bactéries perdent alors leur rigidité et se lysent sous l'effet de leur pression osmotique interne qui rompt leur membrane cytoplasmique d'une part, d'une autre part la configuration spatiale des molécules l'empêchent de traverser les protéines de transport de la membrane externe des bactéries Gram négatif, et ne peuvent pas donc atteindront le peptidoglycane de la paroi bactérienne (Bousseboua, 2001).

A titre de comparaison nos résultats vont dans le même sens que ceux trouvés par (Benhammou, 2006) qui ont montré que l'huile essentielle de la partie aérienne de *P. lentiscus* n'a aucune activité contre les bactéries Gram+ et nous pouvons déduire que les souches à Gram- sont moins sensibles.

Les souches de *E.coli* et *L.monocytogenes* se révèlent les plus résistantes, cela est lié à leurs grandes capacité à développer des résistances à de nombreux agents antimicrobiens, d'où leurs implications sont fréquente dans les infections hospitalières (Mann *et al.*, 2000) Nos résultats concordent avec ceux obtenus par de nombreux auteurs qui rapportent la faible sensibilité de ces souches (Biondi *et al.*, 1993 ; Millezi *et al.*, 2012 ; Yilmaz *et al.*, 2013)



A) *Escherichia coli*

B) *Listeria monocytogenes*

Figure 07 : la sensibilité des Souches testées contre les huiles essentielles des *P.lentiscus*

Néanmoins, certaines études révèlent l'absence de l'activité antimicrobienne sélective vis-à-vis des bactéries Gram+ ou Gram- (Wan *et al.*, 1998 ; Wannissorn *et al.*, 2005 ; Guesmi et Boudabous, 2006).

Il est connu aussi que les espèces bactériennes n'ont pas également la même sensibilité vis-à-vis d'un agent antibactérien. De même dans une population bactérienne, il peut exister des différences individuelles de sensibilité. Ainsi, l'action antibactérienne est parfois partielle et après une diminution du nombre de bactéries, il y'a une reprise de la croissance bactérienne (Dorman et Deans, 2000).

Les résultats obtenue par (Barbouchi *et al.*, 2016), montrent que l'activité antibactérienne de l'huile essentiel de *P.lentiscus* , présent un faible diamètre de zone d'inhibition vis-à-vis les deux souches testées, ce qui similaire avec nos résultats.

Les résultats obtenus nous a permis de confirmer que la variation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles est régie par la composition chimique de l'huile, qui est déterminée par le génotype de la plante et relativement influencée par d'autres facteurs comme l'origine géographique, environnementale et les conditions agronomiques.

A- L'antibiogramme

L'antibiogramme a été réalisé en testant deux antibiotiques sur deux souches Bactériennes de référence (American Type Culture Collection), pour observant le Pouvoir inhibiteur des antibiotiques sur les bactéries. Ce qu'on a fait avec les huiles essentielles, sur l'aromatogramme, on a mesuré les zones d'inhibition autour des disques standards des oxaciline et tétracycline

déposés dans des boîtes ensemencées préalablement avec les mêmes souches utilisées dans l'aromatogramme, les résultats sont présentés ci -dessous (**Tableau 03**)

Tableau 03 : Résultats de l'antibiogramme exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition en mm

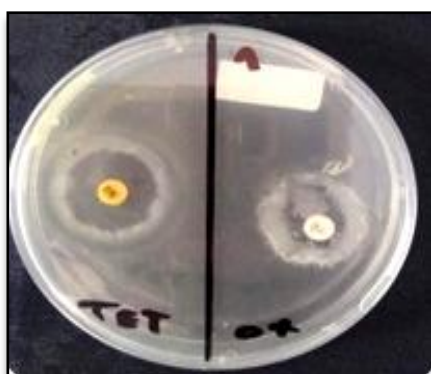
| Agent Antimicrobie | Oxaccilline | Tétracycline |
|------------------------|-------------|--------------|
| <i>E. coli</i> | 18,33 | 37,33 |
| <i>L.monocytogenes</i> | 18,33 | 21,66 |

L'action bactériostatique se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour du disque de l'antibiotique. Le diamètre de la zone d'inhibition diffère d'une bactérie à une autre et d'un antibiotique à un autre.

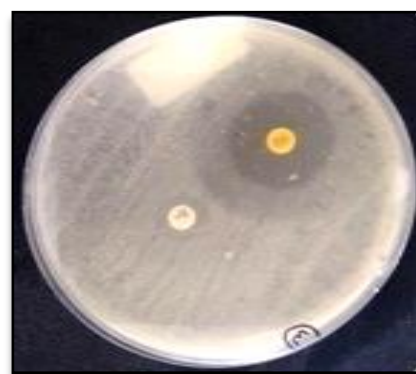
Nos résultats ont montré que tous les antibiotiques ont eu une bonne activité inhibitrice vis-à-vis des différentes souches bactérienne testées avec des diamètres d'inhibition allant de **18 - 38** mm chez Oxacilline et tétracycline vis-à-vis les deux souches.

L'activité antibactérienne des huiles essentielles sont des mélanges complexes de molécules, est généralement inférieure et très variables à celle des molécules d'antibiotiques (Rossi *et al.*, 2007).

Dans la présente étude, nous n'avons testé que de l'huile essentielle pure, parce que, d'après (Manou *et al.*, 1998 ; Bagamboula *et al.*, 2004), il n'y a aucun rapport entre la concentration d'huile essentielle ou du composé actif et la zone d'inhibition ; cette dernière semble dépendre de la capacité des huiles essentielles à diffuser uniformément sur l'agar .



A) *Listeria monocytogenes*



B) *Escherichia coli*

Figure 08 : Photos illustrant la sensibilité des souches bactériennes testées vis-à-vis de l'Oxaccilline et tétracycline

IV- 3 -2 Détermination de la CMI par la méthode de Micro dilution

L'essai des dilutions en série dans les microplaques de 96 puits a révélé des valeurs de CMI (Concentration Minimale Inhibitrice). Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des différentes huiles sur les deux souches bactériennes étudiées ont été alors déterminées et regroupées dans le (Tableau 04)



Figure 09 : Concentration minimale inhibitrice (CMI)

Tableau 04: Valeurs des CMI de l'huile Essentielles de *Pistachia lentiscus*

| Agents Microbiens | 1/2 | 1/4 | 1/8 | 1/16 | 1/32 | 1/64 | 1/128 | 1/254 |
|-------------------------|-----|-----|-----|------|------|------|-------|-------|
| <i>L.monocytogenes</i> | - | - | - | + | + | + | + | + |
| <i>Escherichia coli</i> | - | - | - | + | + | + | + | + |

L'huile essentielle a présenté une CMI ont été inhibé à 1/8 pour les deux souches *E.coli* et *L.monocytogenes*

L'analyse des données montre que comparativement au témoin, il y a une diminution du trouble provoqué par la croissance des germes dans les puits expérimentaux au fur et à mesure que la concentration en HE diminue. Nos résultats montrent que les différentes dilutions ont eu une activité antibactérienne en inhibant la croissance des germes bactériens.

Comme on peut le voir dans (Tableau 04) les résultats ont montré des degrés variables d'activité antimicrobienne contre toutes les souches testées.

Les résultats des CMI obtenues par la méthode de micro dilution montrent qu'ils ne sont pas corrélés avec ceux obtenus par la méthode des disques; l'activité de l'HE de *P.lentiscus*. S'avère plus efficace en milieu liquide.

Cela peut s'expliquer par la diversité moléculaire des huiles qui ne réagissent pas de la même manière, la composition et la concentration de l'HE et sa solubilité dans le milieu utilisé (propriété hydrophobe des huiles). De plus, si les résultats obtenus en milieu liquide sont supérieurs à ceux obtenus en milieu solide, c'est que surtout, en milieu liquide, l'évaporation des huiles essentielles est nulle et donc ces huiles exercent leur activité de manière plus efficace et plus prolongée.

D'après (Dormans et Deans, 2000 ; Kalemba et Kunicka, 2003). L'activité antibactérienne des huiles essentielles ainsi que leur mode d'action sont directement influencés par la nature et la proportion de leurs constituants qui entrent dans leur composition. Les composés souvent responsables de l'activité antibactérienne observée

L'activité antibactérienne peut dépendre aussi de la composition du milieu de Culture (Dorman et Deans, 2000)

IV- 3-3 Détermination des CMB

Le bouillon MH étéensemencé à partir des puits qui n'ont montré aucune croissance (absence de trouble) afin de déterminer les concentrations minimales bactéricides. Les résultats sont résumés dans le (Tableau 05)

Tableau 05 : Concentrations minimales bactéricide (CMB) de l'huile essentielle de *Pistachia lentiscus*

| | 1/2 | 1/4 | 1/8 | CMI | CMB | CMB/CMI | Effet |
|------------------------|-----|-----|-----|-------|-------|---------|-------|
| <i>E.coli</i> | - | - | - | 0,125 | 0,125 | 1 | CMBc |
| <i>L.monocytogenes</i> | - | - | + | 0,125 | 0, 25 | 2 | CMBc |

(+) présence de croissance ; CMBs

(-) Absence de croissance ; CMBc

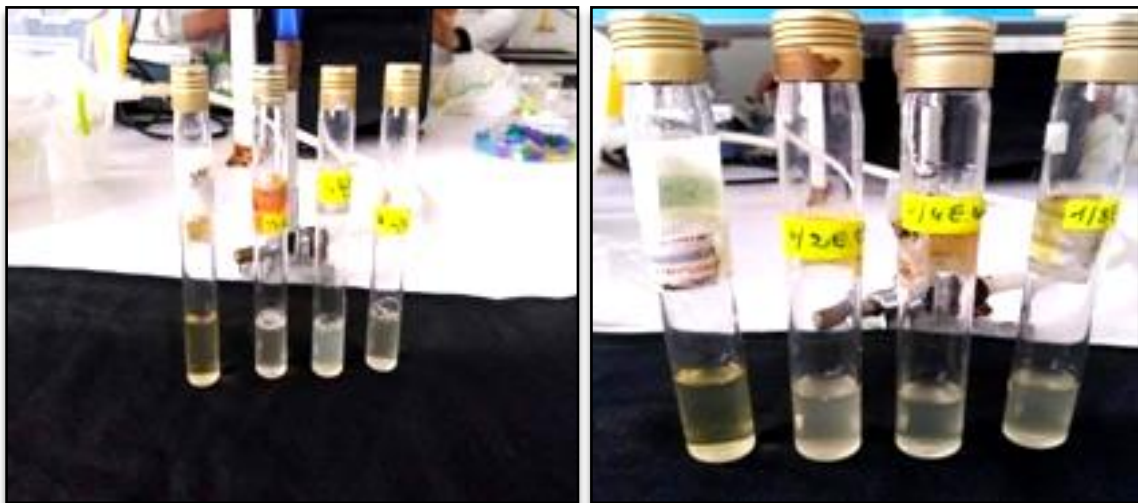
CMBs : Bactériostatique

CMBc : Bactéricide

Les subcultures réalisées suite à l'obtention des CMI ont permis d'observer à la fois, une activité bactéricide et une activité bactériostatique pour les souches G- et G+, A savoir *Listeria monocytogenes* a une activité bactériostatique ou bactéricide et pour *Escherichia coli* a un effet bactéricide

La variabilité des constituants des HEs suggère qu'elles agissent sur plusieurs sites d'action dans les microorganismes, étant donné que chaque composé possède son propre mode d'action (Burt, 2004).

D'après les résultats obtenus, une variabilité dans les CMI et de CMB a été observée, cette variabilité dépend de la nature de la souche testée et la composition chimique de l'extrait étudié.



A) *Listeria monocytogenes*

B) *Escherichia coli*

Figure 10 : Résultats de CMB pour *Escherichia coli* et *Listeria monocytogenes*

IV- 3-4 L'effet du test de la combinaison

Le test de la combinaison a été effectué en combinant les huiles essentielles selon les concentrations suivantes pour la souche *E.coli* en a choisit la concentration $\frac{1}{2}$ et pour *L.monocytogenes* en a utilisé une huile pure avec deux antibiotiques oxacilline et tétracycline. Les résultats de ce test sont récapitulés dans le tableau ci dessous (**Tableau 06**)

Tableau 06 : Les résultats du test de la combinaison des huiles essentielles avec les antibiotiques

| | Oxacilline | | | Tétracycline | | |
|------------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|
| | (E _{he} - D) | (E _{ab} - D) | (E _{he+ab} D) | (E _{he} - D) | (E _{ab} - D) | (E _{he+ab} D) |
| <i>E.coli</i> | 2,33 | 12,33 | 16 | 2,33 | 31,33 | 29 |
| <i>L.monocytogenes</i> | -6 | 12,33 | 9 | -6 | 15,66 | 19,66 |

| | Oxacilline | | | | Tétracycline | | |
|------------------------|------------|-----|------|-------|--------------|------|-------|
| | [C] | [D] | EC | Effet | [D] | EC | Effet |
| <i>E.coli</i> | 1/2 | 22 | 0,99 | ANT | 35 | 1,16 | ANT |
| <i>L.monocytogenes</i> | HE pure | 15 | 0,70 | ANT | 25,66 | 0,49 | ANT |

[D] : Diamètre de zone d'inhibition d'huiles avec l'antibiotique

[C] : Concentration d'huile essentielle

L'effet de la combinaison des huiles essentielles testées avec les antibiotiques varie entre addition, synergie et antagonisme (Mandalari *et al.* , 2007). La combinaison des huiles de *P.lentiscus* avec oxacilline, et la tétracycline a un effet antagoniste avec les deux souches

Même résultat a été rapporté dans les travaux de (Rosato *et al.*, 2007), qui ont testé l'effet de l'association des huiles essentielles de quelques espèces avec la gentamicine.

Alors que l'effet antagoniste, peut s'expliquer par l'interaction entre les différents composés qui peut conduire à des changements de conformation structurale au niveau de la paroi cellulaire des bactéries, conduisant ainsi à la réduction de l'activité inhibitrice (D'Arrigo *et al.*, 2011).

Ces résultats peuvent être dus à la composition des huiles essentielles et celle des antibiotiques et leurs effets entre eux (Rodrigues *et al.*, 2009; Fadli *et al.*, 2011)

Il est utile de rappeler que le pouvoir antimicrobien d'une huile essentielle ne résulte pas nécessairement de l'action d'un constituant chimique seule, mais de l'action d'un ensemble de composés qui interagissent entre eux. Donc, des phénomènes de synergie et d'antagonisme entre les différents constituants peuvent être à l'origine d'une activité beaucoup plus prononcée que celle prévisible par les composés majoritaires (Bouaou *et al.*, 2007).

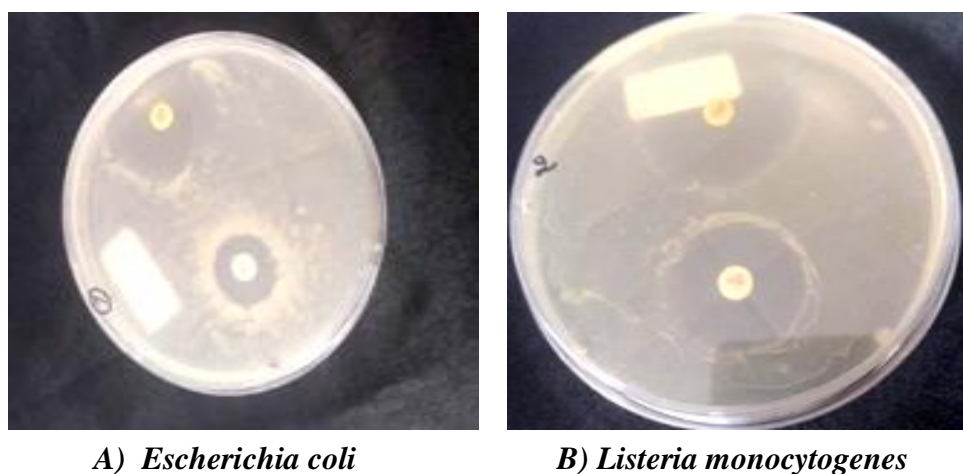


Figure 11 : Résultats d'effets du test de la combinaison d'huile essentielle avec
Les antibiotiques pour *E.coli* et *L.monocytogenes*

Conclusion

Conclusion

Un grand nombre de plantes aromatiques contiennent des composés chimiques ayant des propriétés biologiques différentes. Plusieurs travaux de recherche ont été focalisés sur les huiles essentielles extraites de ces plantes aromatiques. Cependant, les travaux de recherche sur les propriétés antioxydant, antibactérienne et antifongique de certaines plantes sont rares.

Notre étude a montré que l'huile essentielle *Pistachia lentiscus* est de couleur jaune pâle, avec une odeur des agréable et un goût fort.

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques. Une étude des propriétés antimicrobienne a concerné une plante appartient à la famille des *Anacardiacees*, employée en Algérie gras à ses propriétés thérapeutiques.

Par conséquent, l'évaluation de telles propriétés demeure une tâche intéressante et utile, en particulier pour trouver de nouvelles sources d'agents antimicrobiens naturels. Dans ce contexte, nous avons essayé d'évaluer *in vitro* des activités antibactériennes de l'huile essentielle extraite des Galles de *Pistachia lentiscus*

L'hydro distillation des galles de *Pistachia lentiscus* récoltées en printemps au mois de septembre a donné un rendement de **3,25 %**

L'évaluation de l'activité antibactérienne a été appréciée notamment sur des souches bactériennes de référence et connues comme pathogènes pour l'être humain: *Escherichia coli*, et *Listeria monocytogenes* seules et en combinaison avec des antibiotiques conventionnels, en utilisant deux méthodes différentes ; la méthode de diffusion sur disque et la méthode de micro dilution.

L'huile essentielle de *Pistachia lentiscus* présent un effet antibactérien intéressant vis-à-vis des *Escherichia coli* (G-) Alors que s'est révélée inactive contre *Listeria monocytogenes* qui a manifesté une résistance vis-à-vis des huiles essentielles du Pistachier lentisque.

La méthode de micro dilution sur microplaques est la méthode la plus Démonstrative des effets d'interactions entre les agents antimicrobiens.

Ces huiles essentielles peuvent donc servir dans le traitement de certaines Maladies infectieuses, et combattre les bactéries multi résistantes aux antibiotiques usuels. Cette étude pourrait constituer une base pour la mise au point d'une nouvelle génération d'agents antimicrobiens naturels pouvant être utilisés chez l'homme contre les infections rebelles aux antibiotiques classiques.

La comparaison entre les valeurs des CMI et CMB/CMI a montré que notre huile ayant un effet bactéricide vis-à-vis les deux souches

Du fait de la présence de ces effets, il est possible d'utiliser les huiles essentielles comme substitution des antibiotiques pour les éviter des effets indésirables de ces derniers.

L'association des huiles essentielles avec les antibiotiques a montré un effet antagonisme important avec les deux antibiotiques / huiles essentielles. Ces résultats nous permettent de conclure qu'on peut combiner certaines huiles avec les antibiotiques, ce qui peut réduire la dose efficace de ces derniers et minimiser leurs effets secondaires

En fin, nos résultats indiquent que l'huile essentielle des galles de *Pistachia lentiscus* n'a pas une très grande activité antibactérienne.

A l'essor de la présente étude, il serait intéressant de mener une étude plus approfondie sur l'huile essentielle des galles de *P.lentiscus* afin d'isoler, de purifier et d'identifier les composés ayant une activité antibactérienne.

PARTIE 02 :

IN SILICO

Materiels et Méthodes

IN SILICO

I- Matériels

L'objectif essentiel de ce travail consiste à étudier les interactions entre deux molécules : un récepteur et un ligand par Docking moléculaire afin de trouver la « meilleure » correspondance entre les deux.

Pour ce faire, nous avons utilisé le matériel suivant :

I-1 Microordinateur

Nous avons utilisé un microordinateur ayant une mémoire vive de 8 Go de processeur Intel(R) core i7 3.40 GHz et de carte graphique NVIDIA GEFORCE GTX 1060 3GB

Tous les programmes utilisés sont installés sous le système d'exploitation Windows 7 professionnel service pack 1.

I-2 Programmes

Dans cette étude, le programme a été utilisé pour réaliser la partie pratique :

Le programme est « **MOE** » (Molecular Operating Environment) « version 2014.0901 », est un ensemble de plusieurs logiciels (suite package) destinés à la découverte et à la conception assistée par ordinateur de molécules biologiquement actives. Celui-ci permet d'effectuer plusieurs tâches pendant un temps très réduit.

Il permet de dessiner les molécules, de les minimiser pour avoir les meilleures conformations et positions de ces molécules. Il permet également d'arrimer plusieurs ligands rassemblés dans une base de données dans le site actif d'une protéine de manière successive.



Figure 12 : Application MOE Windows

I-3 Banques de Données :

I-3-1 « PDB » (Protein Data Bank):

Est une collection mondiale de données sur la structure tridimensionnelle (structure 3D) des macromolécules biologiques : protéines essentiellement, et acides nucléiques. Ces structures sont essentiellement déterminées par cristallographie aux rayons X ou par spectroscopie RMN.

La PDB contient, au 13 novembre 2013, 95 475 structures de 6 000 à 7 000 structures sont ajoutées chaque année.

La PDB est gratuitement accessible par Internet « <https://www.rcsb.org/> » et contient un grand nombre d'informations complémentaires comme la séquence ou la phylogénie des macromolécules.

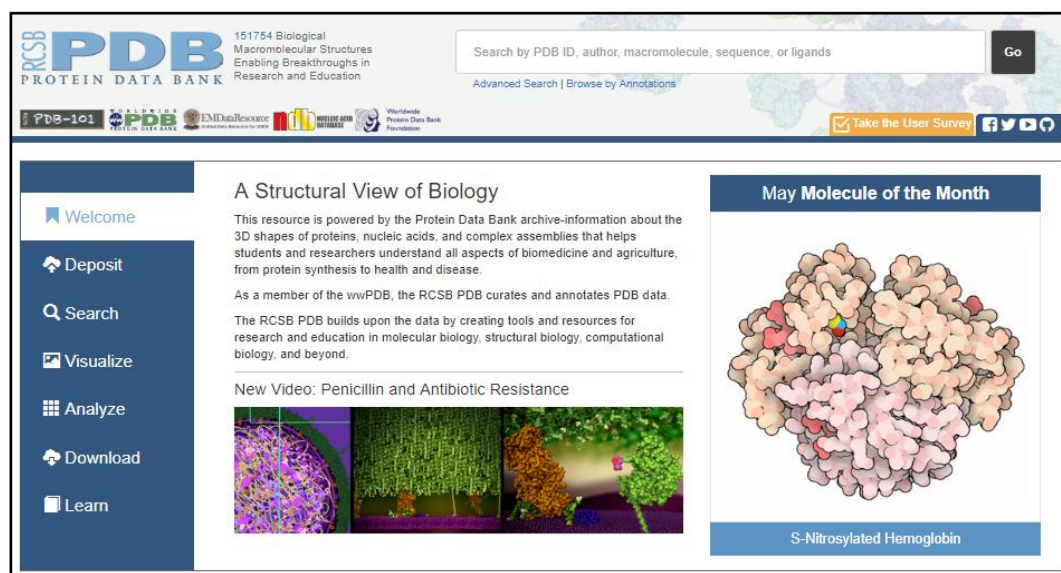


Figure 13 : Page d'accueil de PDB (Protein Data Bank).

I-3-2 « Pubchem »

C'est une banque de données américaine des molécules chimiques gérée par NCBI (le National Center for Biotechnology Information). Elle contient actuellement plusieurs millions de composés dont la structure et les propriétés physico-chimiques sont gratuitement accessibles.

La PubChem est gratuitement accessible par Internet « <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> ».

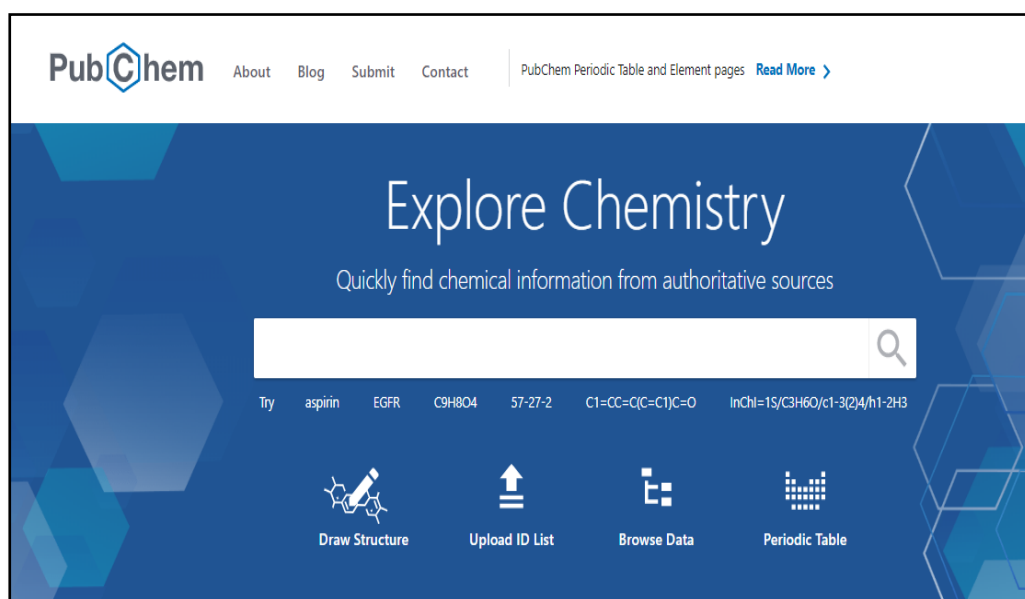


Figure 14 : page d'accueil de PubChem

II- Méthodes

II-1 Choix des protéines

Le choix de différentes protéines que nous avons étudiées selon :

- La meilleure résolution inférieure de 2 Å.
- La présence d'un ligand.

Nous avons utilisé deux protéines :

- 2v2f : penicillin-binding protein 1a (PBP1a)
- 2oqo : Peptidoglycan glycosyltransferase

II-2 Téléchargements des protéines

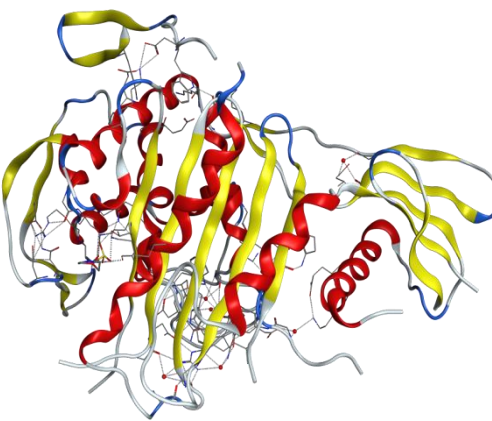

Tableau 07: Les données cristallographique pour les deux protéines

| Code PDB | Classification | Résolution | Chaîne | Ligand |
|----------|----------------|------------|--------|---|
| 2V2F | Transférase | 1.9 Å | A | MES: MORPHOLINO-ETHANE SULFONIC ACID (C ₆ H ₁₃ N O ₄ S) |
| 2OQO | Transférase | 2.1 Å | A | EPE : ETHYL PIPERAZINE ETHANE SULFONIC ACID (C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S) |

II-2-La Démarche à suivre

II-2-1 Préparation de la protéine

- ❖ Les protéines PBP1a et Peptidoglycan glycosyltransferas ont été téléchargé à partir de la base de données PDB «Protein Data Bank » (<https://www.rcsb.org/>).
- ❖ L'élimination des molécules d'eau et les inhibiteurs de Co-cristallisation et les métaux et les doubles chaînes et les cofacteurs, nous permet d'accélérer et d'obtenir un modèle simplifié de l'enzyme

| | |
|--|---|
|  |  |
| <p>Figure 15: protéine 1 code d'accès 2V2F (site PDB)</p> | <p>Figure 16: protéine 2 code d'accès 2OQO (site PDB)</p> |

II-3-2 Préparation la banque de donnée :

Les composés sont obtenues d'après plusieurs articles « (Bouyahya *et al.*, 2019; Aissi *et al.*, 2016 ; Simona *et al.*, 2017; Khiari *et al.*, 2018; Gardeli *et al.*, 2008; Yosr *et al.*, 2018) » et télécharger sur site PubChem gratuitement (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

II-3-3 Docking moléculaire :

L'étude de l'interaction entre le site actif de la protéine et le substrat pour former un complexe stable est réalisée à l'aide du logiciel MOE. Les étapes sont résumées dans (figure 17).

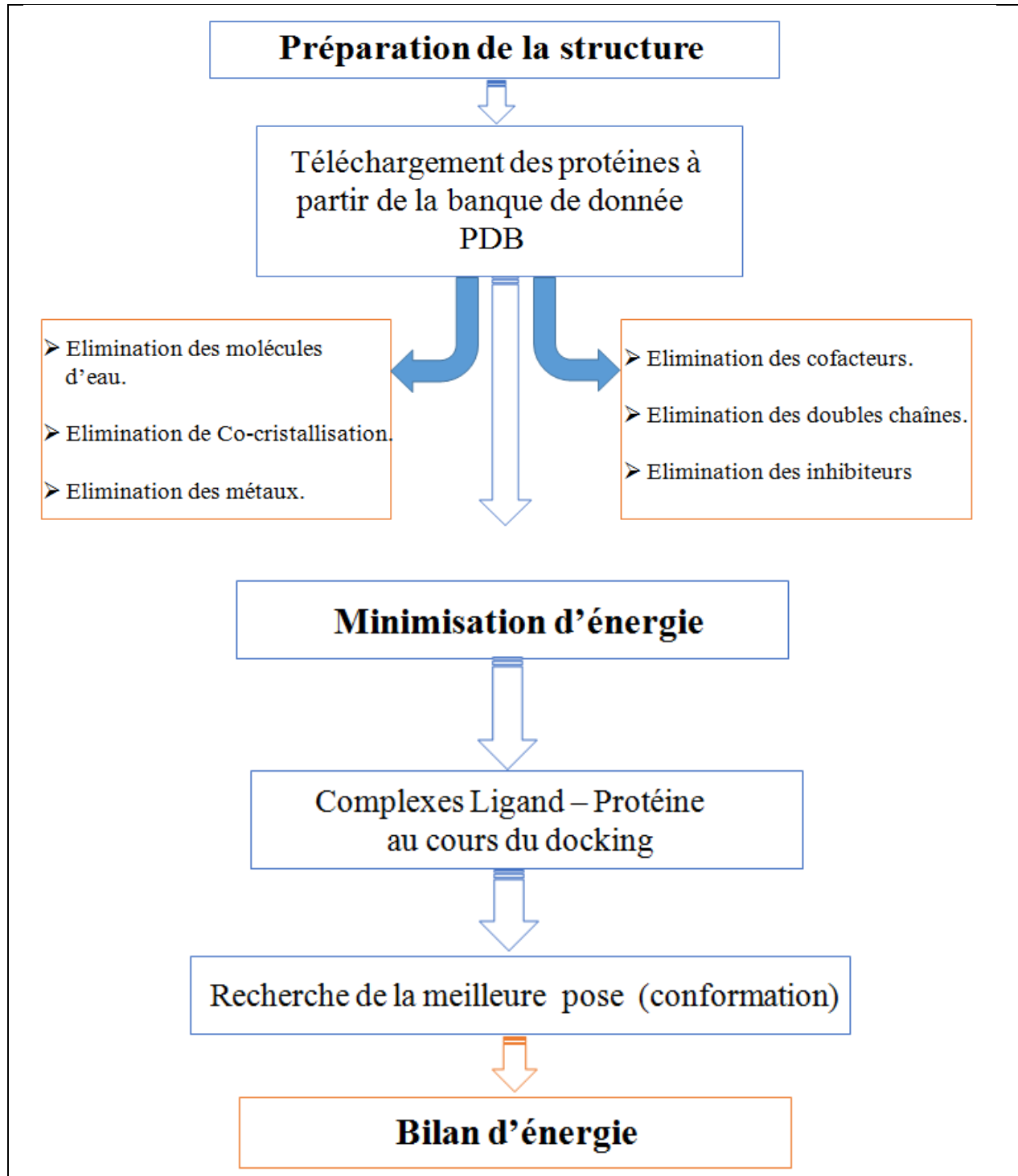


Figure 17: Schéma présentatrice le protocole de MOE (Molecular Operating Environment).

Résultats et Discussion

III. Résultats et Discussion

III .1.La fiabilité du programme MOE Suite

Avant d’aborder l’étude de l’interaction entre protéine et ligand par divers composés (banque de données des huiles essentielles de *Pistachia lentiscus* nous avons tenté d’évaluer la fiabilité du programme MOE Suite utilisé. Pour cela, nous avons procédé au docking du ligand co-cristallisé et calculé la déviation de la pose générée après docking et la pose du ligand co-cristallisé (RMSD : root mean square deviation).

III .1.1.Calcul de la RMSD

La prédiction du mode d’interaction consiste à déterminer le positionnement correct du ligand par rapport à son récepteur. La capacité d’un programme à réussir ce travail est habituellement jugée au moyen de la déviation quadratique moyenne ou RMSD (root-mean-square dérivé) de la position du ligand calculée par le logiciel par rapport au ligand de référence existant au niveau de la PDB. La prédiction est acceptable si sa valeur ne dépasse pas 2 angströms.

Dans notre cas les valeurs de RMSD entre ligand co-cristallisé et ligand arrimé ont été calculées par l’application Super imposition implantée dans Schrödinger Suite. Les résultats du calcul de RMSD obtenus dans notre cas sont présentés dans (tableau 08).

Tableau 08: Valeurs de RMSD avec leur score.

| Protéine | Code PDB | ligand | Score | RMSD (Å) | RMSD max (Å) |
|-----------------------------------|----------|--------|---------|----------|--------------|
| Penicillin-binding protein a1 | 2V2F | MES | -5.7286 | 0.84 | 1.21 |
| Peptidoglycan glycosyltransferase | 2OQO | EPE | -6.0037 | 0.43 | 0.72 |

Le tableau montre que les différentes valeurs du RMSD sont conformes aux résultats de Chikhi et Bensegueni (2008), et Gabb J *et al.*, 1997 qui démontrent que tout programme de docking n’est performant que lorsque le RMSD est inférieur ou égale à 2 Å.

III .1.2.L’analyse visuelle

L’analyse visuelle est une étape essentielle pour confirmer les résultats du calcul de RMSD. Elle permet de déterminer si un ligand simulé se superpose avec le ligand Co-cristallisé.

La visualisation des résultats du docking moléculaire réalisée avec les deux protéines du **tableau 08** montre que les modèles des ligands simulés par MOE sont correctement placés dans

le site actif de chaque protéine. Ils présentent des conformations spatiales parfaitement superposables à celles déterminées expérimentalement par cristallographie qu'on retrouve dans la PDB.

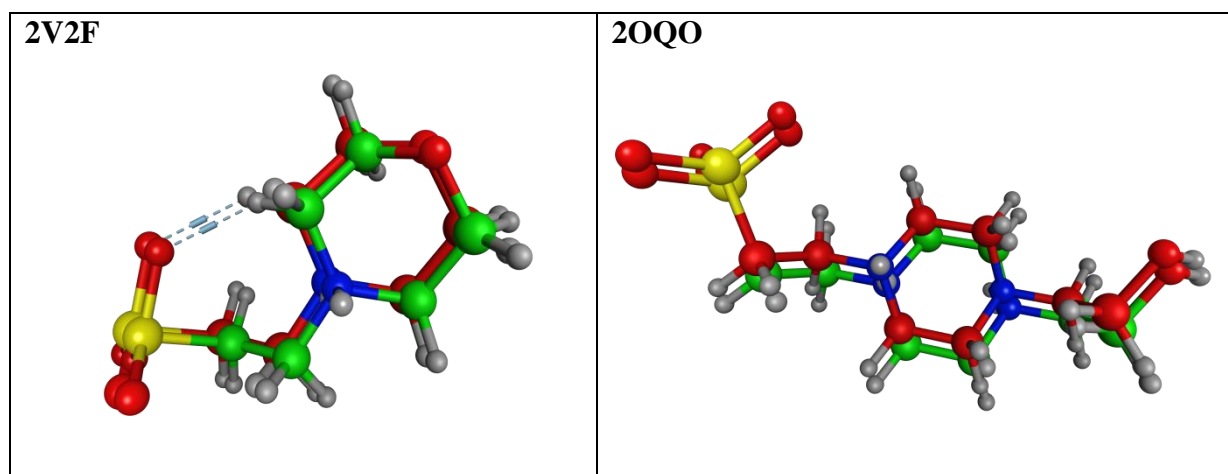


Figure 18: Superposition de la géométrie des ligands obtenu par cristallographie (coloré en rouge) et celle calculée par docking moléculaire avec MOE (coloré en vert).

III .1.3.Conclusion

A la lumière des résultats obtenus avec le calcul de RMSD et l'analyse visuelle, nous pouvons conclure que le programme MOE est hautement performant qu'on peut l'utiliser sans trop risque d'erreurs, pour générer par simulation *in silico* des complexes.

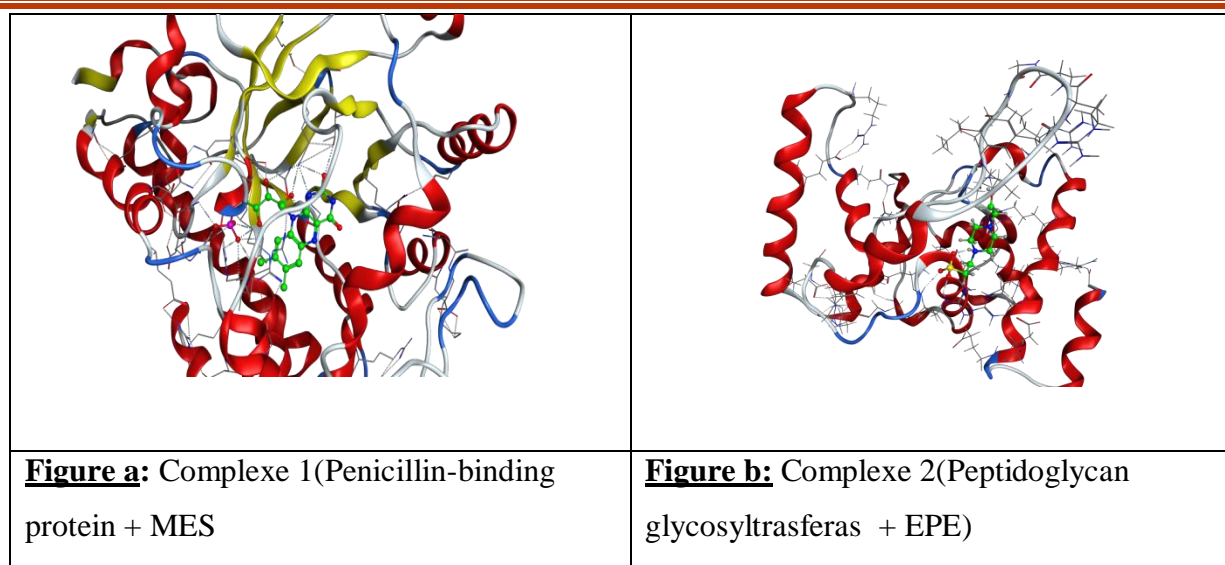
III .2. Résultats

III .2.1.Etude des interactions « Protéine - Ligand » par MOE Suite

Le docking moléculaire permet de positionner les ligands au sein du site actif du récepteur des différentes enzymes.

Le complexe ligand- récepteur formé, adoptera la conformation la plus stable, engendrant un Niveau énergétique le plus faible. La recherche de la conformation la plus favorable entre de ligand (flexible) et le récepteur (rigide). Pour chaque ligand, un certain nombre de conformations appelées poses.

Notre démarche consiste d'abord d'étudier l'interaction entre protéines – ligands. A l'aide du programme MOE Suite, nous avons relevé le meilleur score c'est-à-dire celui qui a l'énergie la plus basse correspond aux meilleures interactions entre le ligand et le site actif de l'enzyme. Les résultats sont regroupés dans (figure 19).



Figures 19: Le Docking des 2 complexes

L'ensemble des molécules a été modélisé à l'aide du logiciel MOE (Molecular Operating Environment). Chaque modèle a été relaxé en énergie afin de trouver sa conformation énergétique.

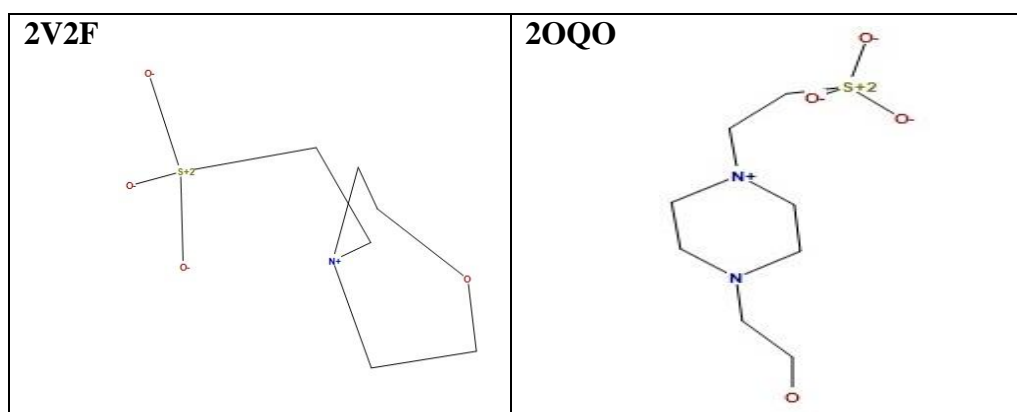


Figure 20: Images de meilleures poses (conformations).

Tableau 10 : Le bilan énergétique des 2 complexes (Kcal/mol).

| Molécules | S | S. α | Rmsd | Rmsd_Refine | E_Conf | E_Place | E_Scor1 | E_Refine | E_Scor2 |
|------------|---------|-------------|--------|-------------|-----------|-----------|----------|----------|----------|
| Complexe 1 | -6.9282 | 2.7538 | 1.0578 | 2.0201 | -309.2409 | -156.2359 | -17.7087 | -28.2151 | -14.2166 |
| Complexe 2 | -7.7465 | -7.9421 | 1.6767 | 2.3022 | -231.9282 | -83.1883 | -12.3752 | -16.6758 | -18.2974 |

Le tableau précédent montre le bilan énergétique des meilleures poses. En raison de la similarité seulement les résultats ont été extraits et publiés.

- **S**: le score final ; c'est le score de la dernière étape.
- **S. α** : le score final de α - tocopherol (ligand de référence) ; c'est le score de la dernière étape.
- **Rmsd_refine** : l'écart quadratique moyen entre la pose avant de raffinement et de la Pose après raffinement.
- **E_conf** : l'énergie du conformère.
- **E_place** : score de la phase de placement.
- **E_scor1** : score de l'étape de la première notation,
- **E_refine** : score de l'étape de raffinement et nombre de conformations générées par ligand.
- **E_scor2** : score de l'étape de la première notation.

III .3.Discussion

Le bilan énergétique des deux complexes est représenté dans (tableau 10). Il est a noté que les ligands interagissent avec les protéines.

Sur la base des résultats d'amarrage :

- Le complexe 1 présente 5 poses avec le meilleur score celui du numéro 1 (énergie la plus faible -6.9282 Kcal/mol).
- Le complexe 2 présente 5 poses avec le meilleur score celui du numéro 1 (énergie la plus faible -7.7465 Kcal/mol).

Ces résultats montrent que l'orientation des ligands joue un rôle très important pour le positionnement des ligands dans le site actif de l'enzyme, on peut conclure que l'introduction De groupes volumineux provoque un réarrangement de la conformation à l'intérieur de la cavité du site actif, ce qui sera probablement la complémentarité et par conséquent l'activité.

Les résultats suivants ont révélé que le complexe 2 a l'énergie la plus faible (-7.7465 Kcal/mol) est plus actif que le complexe 1 (-6.9282 Kcal/mol)

La procédure de docking permet de générer une liste de complexes représentant les modes d'association favorables entre le ligand et le récepteur macromoléculaire. L'étape suivante consiste à évaluer ces complexes, afin de trouver celui ou ceux les plus susceptibles de reproduire au mieux le mode d'association réel. L'association entre protéines et ligands est gouvernée par plusieurs paramètres thermodynamiques : les interactions hydrophobes, les interactions électrostatiques et les interactions hydrogènes.

III.4. Les interactions Electrostatiques

Certains acides aminés peuvent être chargés positivement ou négativement, ce qui donne lieu à des phénomènes électrostatiques qui favorisent la formation d'un complexe protéique spécifique (**Figure 21, 22, 23, 28**). Ces interactions électrostatiques agissent à "longues" distances entre des groupes d'atomes électriquement chargés. Lorsqu'elles concernent les interactions de type dipôle / dipôle permanent d'une part et les ponts salins d'autre part. Ces derniers, correspondent aux interactions entre régions chargées déterminées par les lois de l'électrostatique. A pH physiologique, les résidus chargés positivement (couleur **bleu**) sont les acides aminés basiques et l'extrémité N-terminale de la chaîne polypeptidique, les résidus chargés négativement (couleur **rouge**) sont les acides aminés acides et l'extrémité C-terminale et les résidus neutres (couleur blanc) sont les acides aminés neutres.

Résultats :

+ Complexe 01 : PENICILLIN-BINDING PROTEIN 1a (PBP1a)

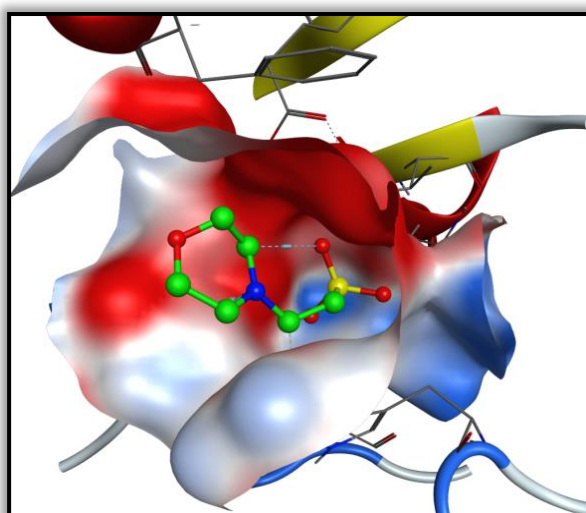


Figure 21: Récepteur de PBP1a

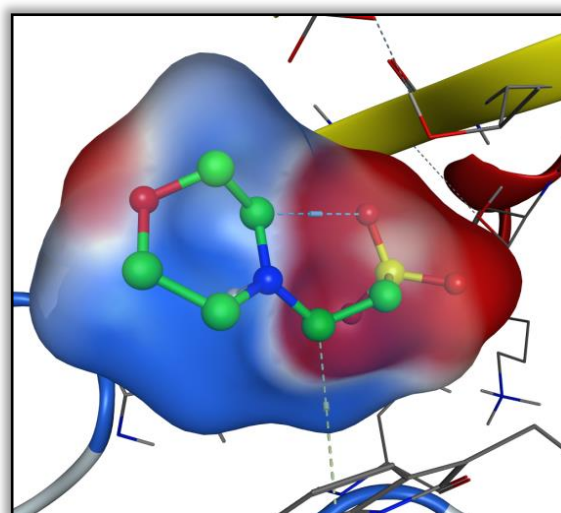


Figure 22: Ligand MES de PBP1a

Figure 21 et **Figure 22**: Montre que le récepteur de la PBP1a et leur ligand (MES) dans le champs électrostatique ; ont observent la plupart des régions de récepteur en **rouge** chargée négativement c'est-à-dire possède des acides aminés acides par contre la plupart des régions de ligand en **bleu** chargée positivement c'est-à-dire possède des acides aminés acides basique donc la partie de récepteur chargée négativement, est attirée aux atomes chargés positivement (ligand).

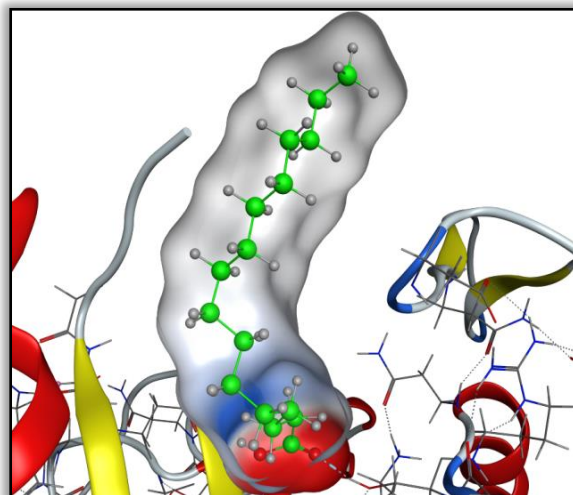
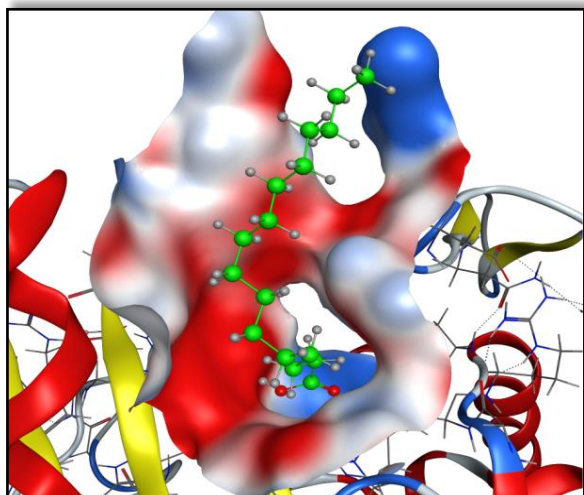


Figure 23: Récepteur de Hexadecanoic acid

Figure 24: Ligand de Hexadecanoic acid

Figure 23 et **Figure 24** : Montre que le récepteur de la PBP1a et le ligand (Hexadecanoic acid) dans le champ électrostatique ; ont observent la plupart des régions de récepteur en rouge chargée négativement c'est-à-dire possède des acides aminés acides par contre la plupart des régions de ligand en blanc c'est-à-dire possède des acides aminés neutre

✚ **Complexe 02** : PEPTIDOGLYCAN GLYCOSYLTRANSFERA

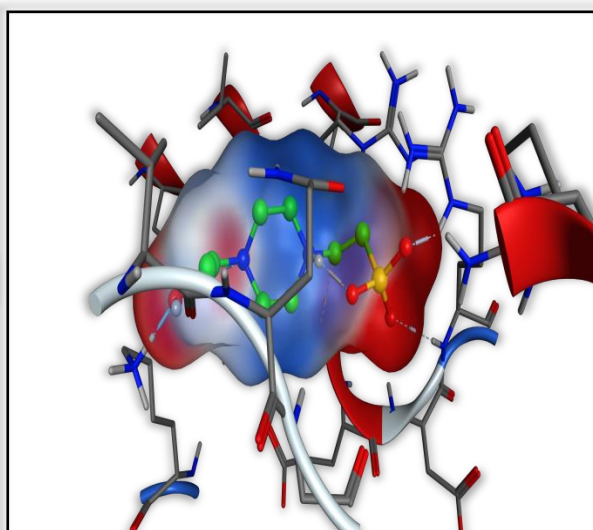
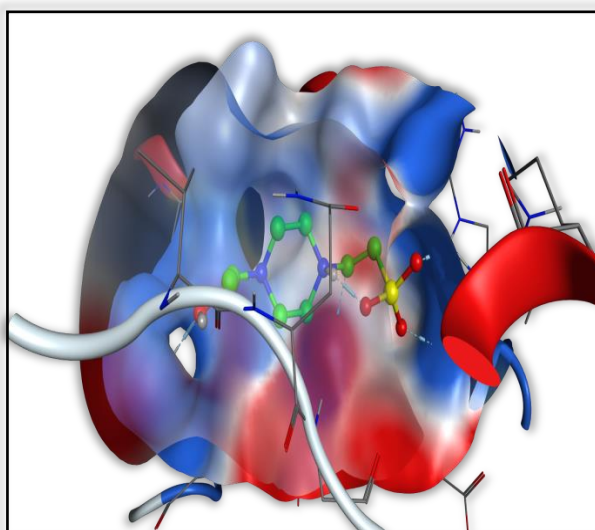


Figure 25 : Récepteur Peptidoglycan glycosyltransferas

Figure 26 : Ligand EPE de Peptidoglycan glycosyltransferas

Figure 25 et Figure 26 : Montre que le récepteur de la PEPTIDOGLYCAN GLYCOSYLTRANSFERAS et leur ligand (EPE) dans le champ électrostatique ; ont observent la plupart des régions de récepteur en **bleu** chargée positivement c'est-à-dire possède des acides aminés basique par contre la plupart des régions de ligand en **rouge** chargée négativement c'est-à-dire possède des acides aminés acides donc la partie de récepteur chargée positivement, est attirée aux atomes chargée négativement (ligand).

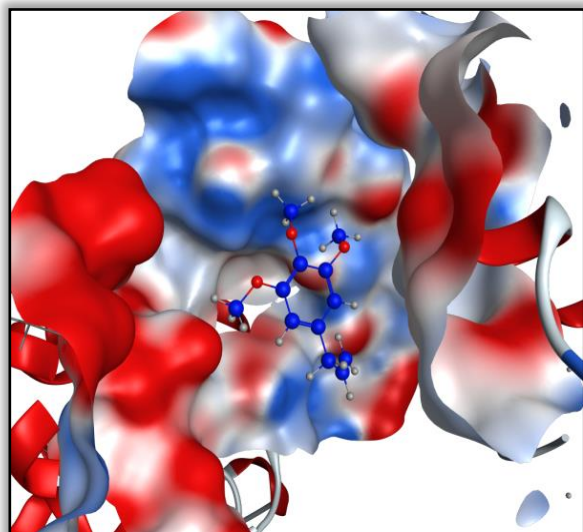


Figure 27: Récepteur d'Elemicin

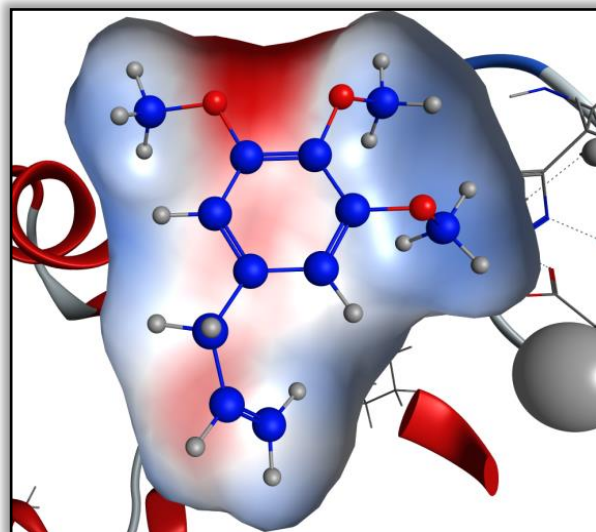


Figure 28: Ligand d'Elemicin

Figure 27 et Figure 28 : Montre que le récepteur de le Elemicin et le ligand Elemicin dans le champ électrostatique ; ont observent la plupart des régions de récepteur en **bleu** donc chargée positivement c'est-à-dire possède des acides aminés basique par contre la plupart des régions de ligand en **blanc** c'est-à-dire possède des acides aminés neutre.

III.5. Les interactions Hydrophobe (Lipophilicité)

Afin de rendre compte plus finement des interactions protéine-Ligands, d'autres critères fondés sur l'énergétique peuvent être pris en compte :

L'effet hydrophobe : plusieurs acides aminés hydrophobes (formant un "patch" hydrophobe, couleur verte) et aussi certaines acides aminés hydrophiles (formant un "patch" hydrophiles, couleur violette en contact à l'interface "complémentarité hydrophobe" entraînent une interaction stabilisante pour beaucoup de complexes.

Résultats

✚ **Complexe 01:** PENICILLIN-BINDING PROTEIN 1a (PBP1

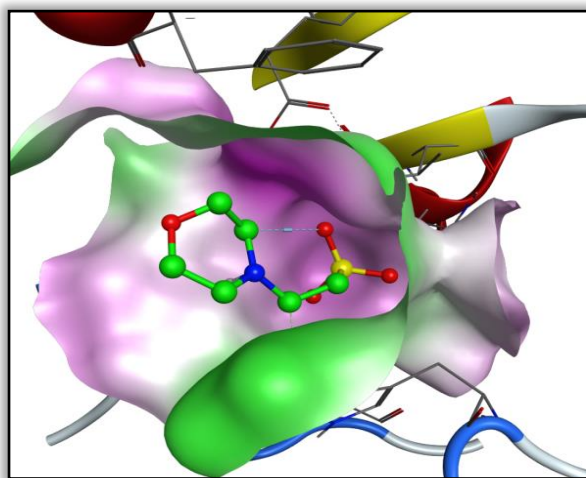


Figure 29: Récepteur de PBP1

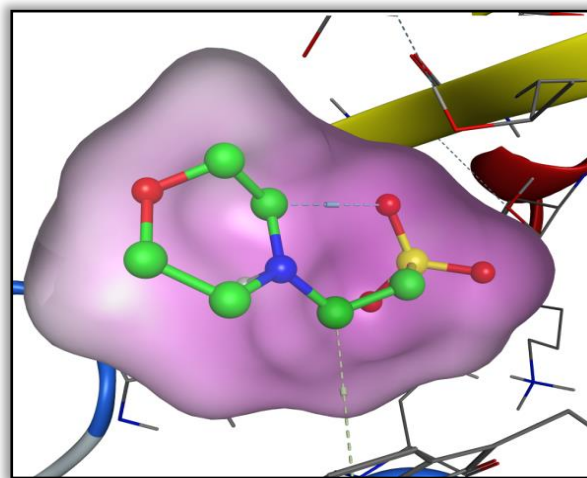


Figure 30 : Ligand MES de PBP1

Figure 29 et **Figure 30** : Montre que le récepteur de la PBP1 et leur ligand (MES) dans le "patch Hydrophobe" et "patch"Hydrophile ont observent la plupart des régions de récepteur sont de couleur violette et verte c'est-à-dire possède des acides aminés hydrophile et hydrophobe (lipophile) à la fois par contre la plupart des régions de ligand sont de couleur violette c'est-à-dire possède des acides aminés.

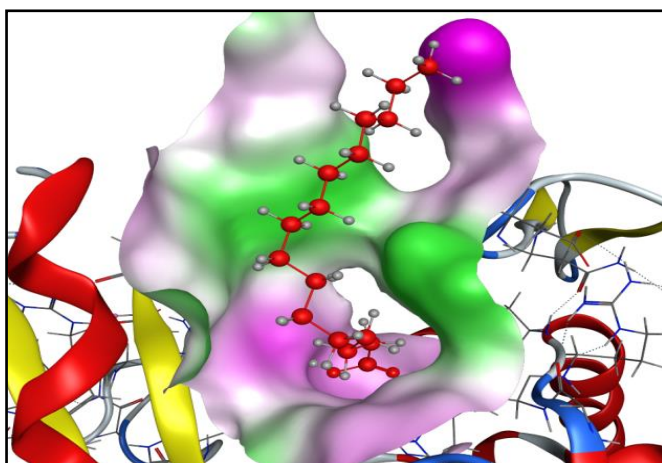


Figure 31: Récepteur de Hexadecanoic acid

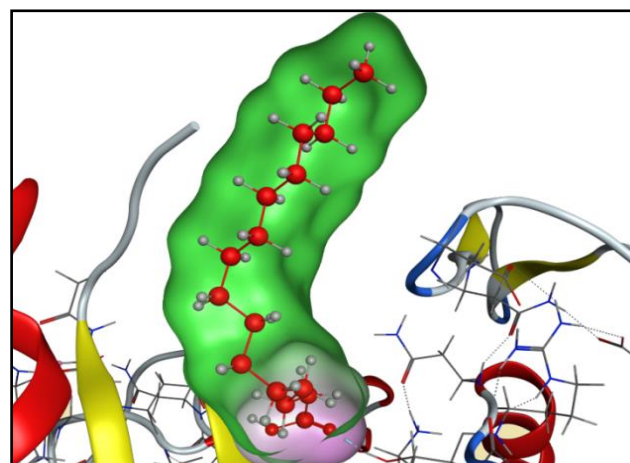


Figure 32: Ligand de Hexadecanoic acid

Figure 31 et **Figure 32** : Montre que le récepteur de la PBP1 et ligand Hexadecanoic acid dans le "patchHydrophobe" et "patch Hydrophile" ont observent la plupart des régions de récepteur sont de couleur violette c'est-à-dire possède des acides aminés hydrophiles par contre la plupart des régions de ligand sont de couleur verte c'est-à-dire possède des acides aminés hydrophobe (lipophile).

✚ **Complexe 02** : PEPTIDOGLYCAN GLYCOSYLTRANSFERAS

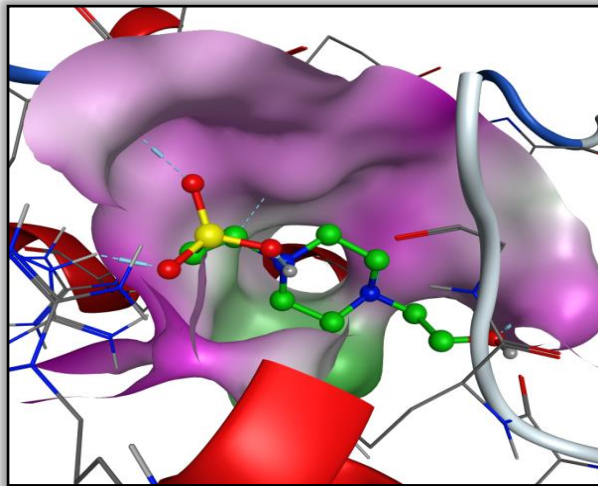


Figure 33: Récepteur de Peptidoglycan glycosyltransferas

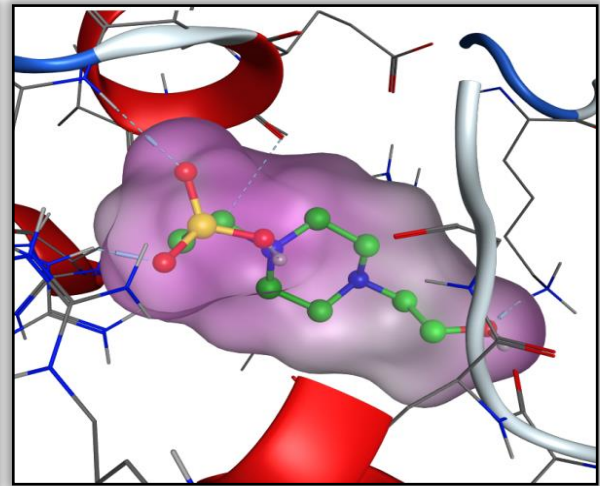


Figure 34: Ligand EPE de Peptidoglycan glycosyltransferas

Figure 33 et **Figure 34**: Montre que le récepteur de la PEPTIDOGLYCAN GLYCOSYLTRANSFERAS et leur ligand (EPE) dans le "patch Hydrophobe" et "patch Hydrophile " ont observent la plupart des régions de récepteur et ligand sont de couleur violette c'est-à-dire possède des acides aminés hydrophiles.

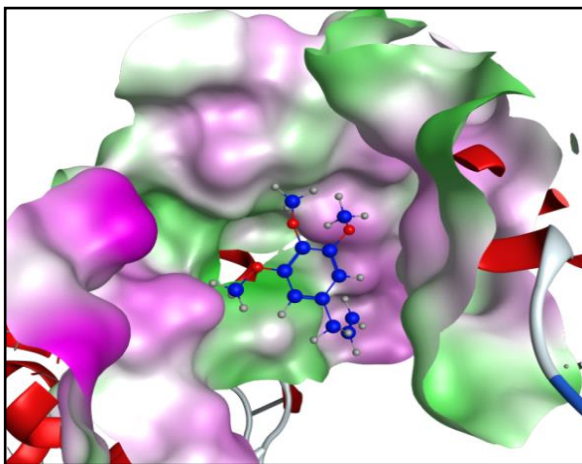


Figure 35: Récepteur d'Elemicin

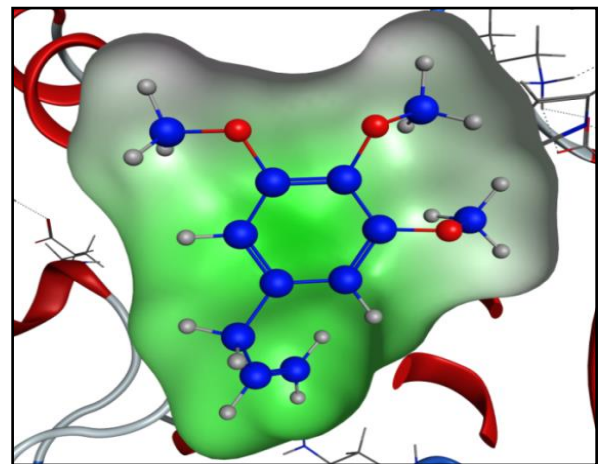


Figure 36: Ligand d'Elemicin

Figure 35 et **Figure 36** : Montre que le récepteur de la PEPTIDOGLYCAN GLYCOSYLTRANSFERAS et le ligand (Elemicin) dans le "patch Hydrophobe" et "patch Hydrophile" ont observent la plupart des régions de récepteur sont de couleur violette c'est-à-dire possède des acides aminés hydrophiles et certains région de couleur verte c'est-à-dire possède des acides aminées lipophile par contre la plupart des régions de ligand sont de couleur verte c'est-à-dire possède des acides aminés lipophile (hydrophobe).

Discussion

De ce fait, des méthodes approximatives ont été développées pour distinguer (évaluer et classer) les complexes parmi ceux générés par une procédure de docking : les fonctions de score. (Jain A, 2006). (Le scoring) est l'étape de classement, qui consiste à évaluer l'affinité entre le ligand et la protéine et de donner un score aux poses obtenues lors de la phase de docking. Ce score permettra de retenir la meilleure pose parmi toutes celles proposées. (Warren G.L, 2006)

✚ Complexe 01 : PENICILLIN-BINDING PROTEIN 1a

Dans les interactions électrostatiques ; on observe la plupart des acides aminés de (**Hexadecanoic acid**) possède une charge différente du ligand de (**MES**) de la protéine PBP1a et d'autre côté pour les interactions hydrophobes on observe la plupart des acides aminés situés dans un pôle différent que le ligand (**MES**).

Les résultats suivants ont révélé que le **Hexadecanoic acid** a l'énergie la plus faible (-6.9282 Kcal/mol) est plus actif que le ligand **MES** (-5.7286 Kcal/mol),

✚ Complexe 02 : PEPTIDOGLYCAN GLYCOSYLTRANSFERASE

Dans les interactions électrostatiques ; on observe la plupart des acides aminés de (**Elemicin**) possède une charge différente que le ligand (**EPE**) de la protéine : PEPTIDOGLYCAN GLYCOSYLTRANSFERASE et d'autre côté pour les interactions hydrophobes on observe la plupart des acides aminés situés dans un pôle différent que le ligand (**EPE**).

Les résultats suivants ont révélé que le **Elemicin** a l'énergie la plus faible (-7.7465 Kcal/mol) est plus actif que le ligand **EPE** (-6.0037 Kcal/mol).

III.6 .Interactions ligands

Le ligand est disposé et rendu à l'aide d'une version améliorée de la représentation 3D de disposition, et les résidus de protéines sont disposés autour d'elle afin d'indiquer des liens de proximité spatiale.

Les interactions comprises entre 2.5 Å et 3.1Å sont considérées comme fortes et celles comprises entre 3.1Å et 3.55Å sont supposées moyennes. Les interactions supérieures à 3.55Å sont faibles.

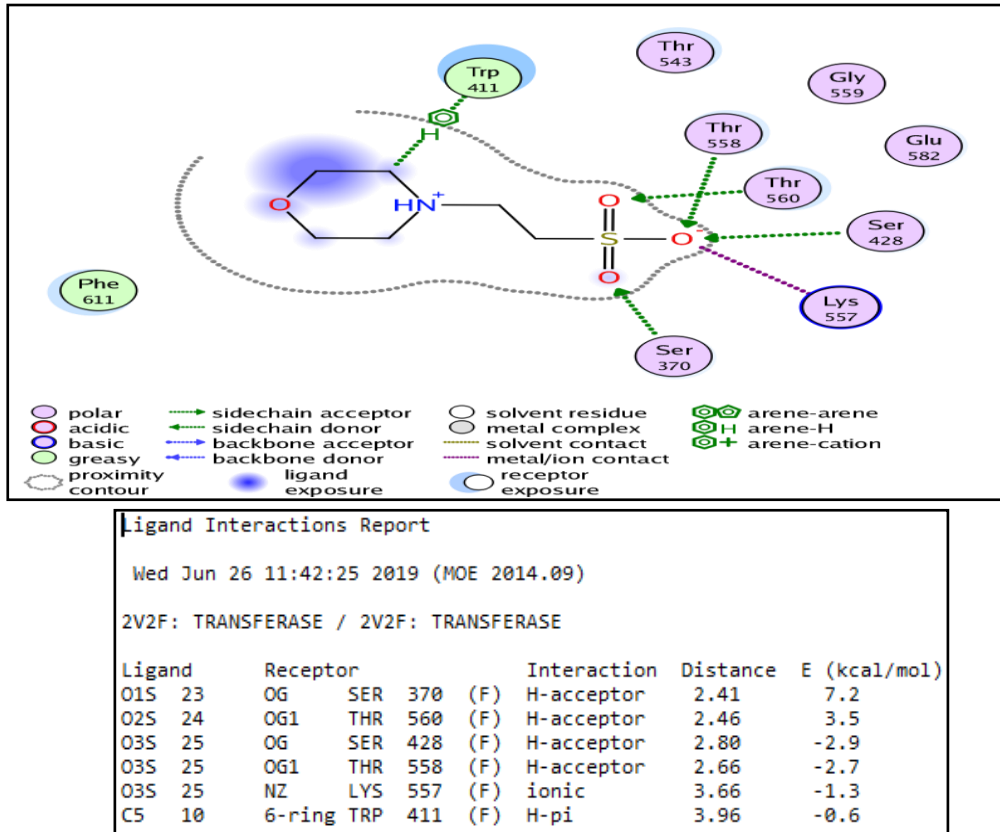


Figure 37 : Diagramme d'interaction du complexe 1 (PBPa1 + MES)

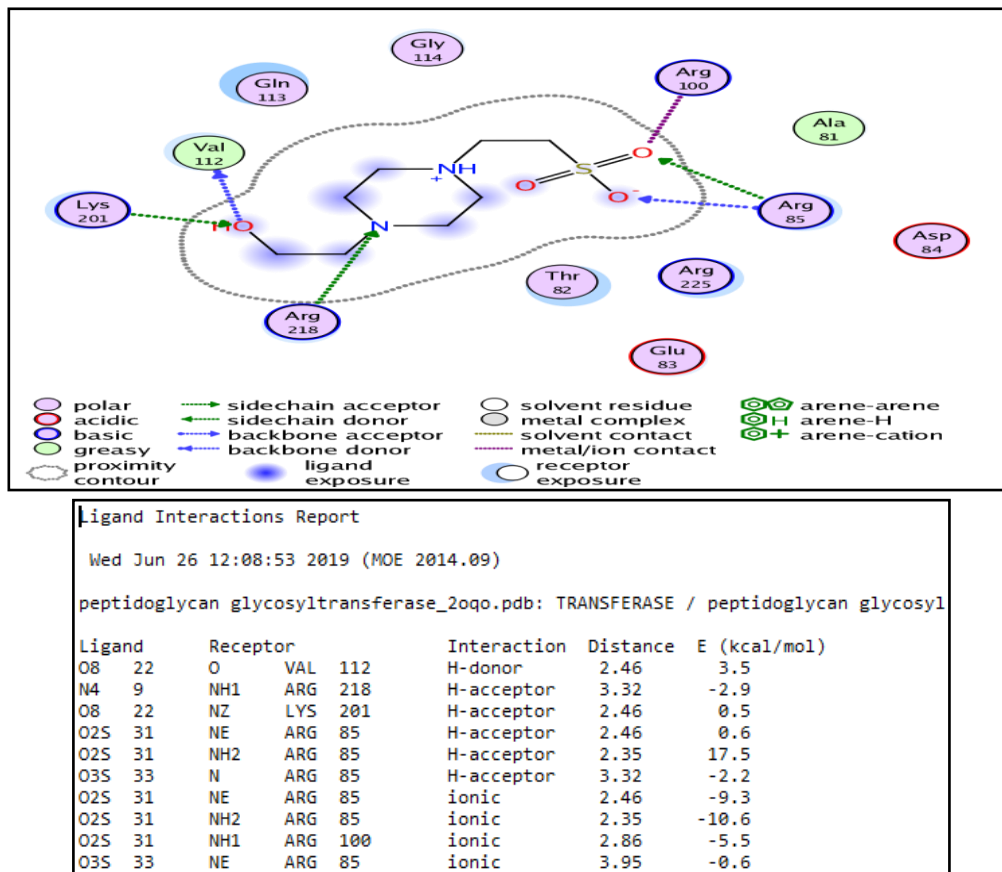


Figure 38: Diagramme d'interaction du complexe 2 (peptidoglycan glycosyltransferas + EPE)

Il ressort qu'après l'examen des différents diagrammes révèlent l'existence de plusieurs interactions responsable de l'affinité entre enzyme-substrat, et par suite les stabilités relatives.

- Le complexe 1 : MES a des interactions avec les résidus : SER 370, THR 560, SER 428, THR 558, LYS 557, TRP 411 et les distances de 2.41 Å, 2.46 Å, 2.80 Å, 2.66 Å, 3.66 Å, 3.96 Å respectivement (pour le 1^{er}, le 2^{ème}, 3^{ème} interactions forte, et pour le 5^{ème}, 6^{ème} interaction faible) ce qui suggère que MES peut inhiber l'enzyme PBP1 et la présence d'une liaison hydrogène entre le groupe hydroxyle du MES et les résidus.

- Le complexe 2 : EPE a des interactions avec les résidus : VAL 112, ARG 218, LYS 201, ARG 85 , ARG 85, ARG 85, ARG 85, ARG 100, ARG 85 et les distances de 2.46 Å, 3.32 Å, 2.46 Å, 2.46 Å, 2.35 Å, 3.32 Å, 2.46 Å, 2.35 Å, 2.86 Å, 3.95 Å respectivement (pour le 1^{er}, 3^{ème}, 4^{ème} , 5^{ème}, 7^{ème}, 8^{ème}, 9^{ème} interactions forte, et pour le 2^{ème}, 6^{ème} interaction moyenne et pour le 10^{ème} interaction faible) ce qui suggère que EPE peut inhiber l'enzyme peptidoglycan glycosyltransferas et la présence d'une liaison hydrogène entre le groupe hydroxyle du EPE et les résidus.

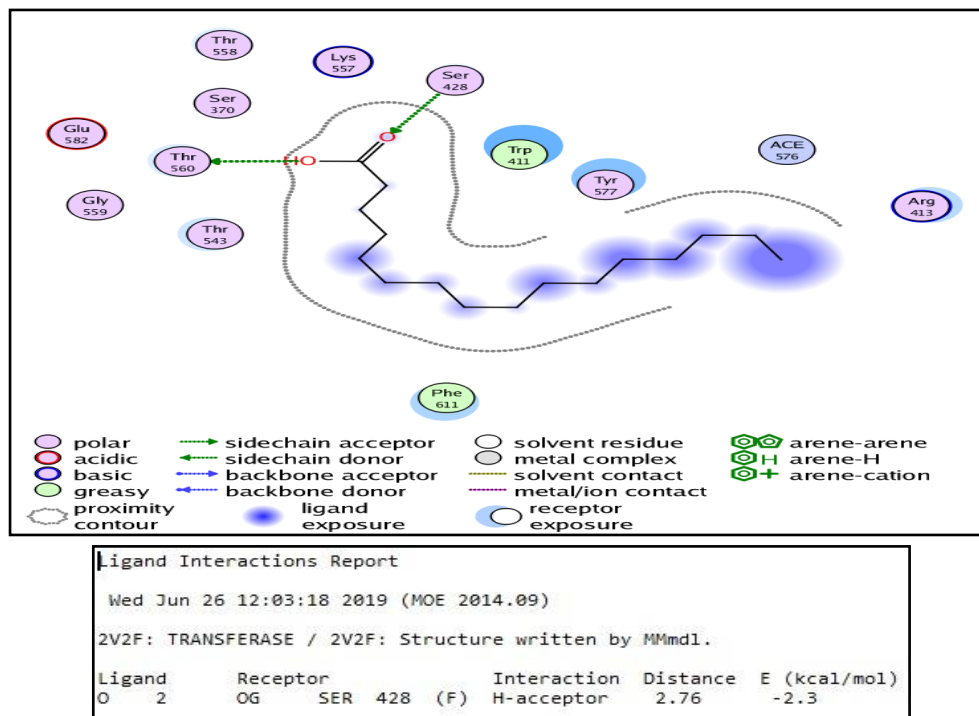


Figure 39 : Diagramme d'interaction ligand de de meilleur score (hexadecanoic acid) de PBP1.

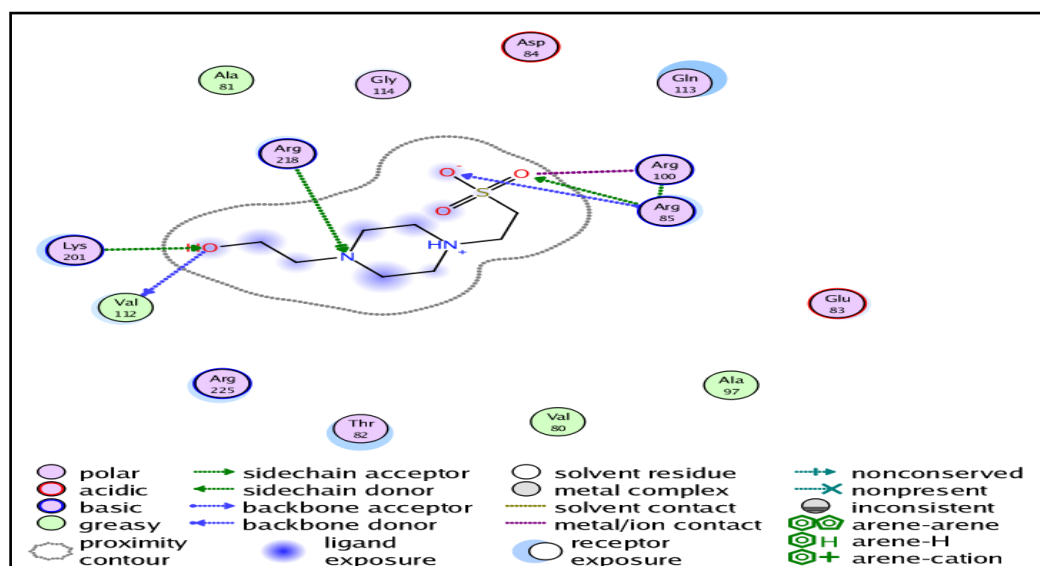


Figure 40 : Diagramme d'interaction ligand de meilleur score (Elemicin) de peptidoglycan glycosyltransferas.

Le docking moléculaire avec MOE du composé 1 au sein du site actif de la protéine PBP_a1 donne l'un des meilleurs scores (-6.9282 Kcal/mol). Néanmoins, ce composé « hexadecanoic acid » forme aucune liaison hydrogène et arene lors de son interaction avec le site actif (**Figure 39**) au profit des nombreuses interactions hydrophiles et lipophiles avec les résidus qui stabilisent le complexe (**Tableau 11**)

Le complexe 2 se présente comme un meilleur score égal (-7.7465 Kcal/mol) ces résultats sont en accord avec le composé « Elemicin » forme aucun liaison hydrogène et arene lors de son interaction avec le site actif (**Figure 40**).

Conclusion

Les résultats obtenus lors du docking ont montré que :

- Le complexe 1 présente une énergie de score (-6.9282 Kcal/mol) plus faible que l'énergie de MES (-5.7286 Kcal/mol).
- Le complexe 2 présente une énergie de score (-7.7465 Kcal/mol) plus faible que l'énergie d'EPE (-6.0037 Kcal/mol).

Les résultats obtenus à l'aide de logiciels MOE révèle que il n'existe aucune interaction c'est-à-dire une très faible activité (in vitro).

Tableau 11 : Les liaisons d'interactions des 2 complexes.

| Protéine | Ligand | Meilleur score |
|--|---|--|
| penicillin-binding protein 1a (2V2F) | Résidus d'interaction : | Résidus d'interaction : |
| | (Hydrophile) | (Hydrophile) |
| | Glu 582 , Ser 370, Lys 557, Thr 558, Thr 543, Tyr 577, Ser 428, Thr 560, Gly 559. | Glu 582 , Ser 370, Lys 557, Thr 558, Thr 543, Tyr 577, Ser 428, Thr 560, Gly 559, Arg 413. |
| | (Lipophile) green | (Lipophile) |
| | Trp 411, Phe 611. | Trp 411, Phe 611. |
| | Interaction Hydrogène: | Interaction Hydrogène: |
| | Ser 370, Thr 560, Ser 428, Thr 558. | Ser 428 |
| | Interaction Arene : | Interaction Arene: |
| Trp 411 | / | |
| peptidoglycan glycosyltransferase (2OQO) | <u>Résidus d'interaction :</u> (Hydrophile) : | <u>Résidus d'interaction :</u> (Hydrophile) : |
| | Arg 100, Arg 85, Arg 225, Arg 118, Gly 114, Lys 201, Thr 82, Glu 83, Asp 84. | Asp 84, Gln 113, Arg 100, Arg 85, Glu 83, Thr 82, Arg 225, Lys 201, Arg 218, Gly 114 |
| | (Lipophile): | (Lipophile): |
| | Ala 81, Val 112. | Val 80, Ala 97, Ala 81, Val 112. |
| | Interaction Hydrogène: | Interaction Hydrogène: |
| Val 112, Arg 218, Lys 201, Arg 85. | / | |

Conclusion

Conclusion finale *in silico*

L'interaction entre une protéine et son substrat est la première étape de la plupart des réactions biologiques. Comprendre son mode de fonctionnement et définir quels sont les résidus mis en jeu:

- L'affinité entre deux molécules.
- Les distances entre les acides amines du site actif de l'enzyme.
- L'énergie d'interaction.

La flexibilité des molécules biologiques résulte de la haute dimensionnalité des systèmes, mais aussi de l'intervention d'un grand nombre d'interactions faibles (liaison hydrogène, effet hydrophobe, ...). Il est connu qu'elle fait partie intégrante de la dynamique des macromolécules et de leur bon fonctionnement. La négligence de ce paramètre dans les calculs introduit à des erreurs, il convient donc de déterminer la flexibilité intrinsèque d'une Molécule mais aussi de pouvoir l'introduire, au moins partiellement, dans une procédure de Docking (Carlson H.A, 2000; Carlson H.A, 2002. 6; Carlson H.A, 2002.8; Teague S.J, 2003).

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 (ligands) qui interagissent avec une cible biologique d'intérêt thérapeutique, généralement protéique (récepteur), afin d'influencer le mécanisme dans lequel cette protéine est impliquée (Grosdidier A, 2007).

D'après les résultats obtenue le calcul de l'énergie de « docking suite score » a été effectué pour former les complexes et identifier les interactions existantes, enfin nous constatons que le complexe 02 (PEPTIDOGLYCAN-GLYCOSYLTRANSFERAS) possède une énergie la plus basse avec votre ligand **EPE (-6.0037)**, par la suite un meilleur score avec le **Elemicin (-7.7465)** par rapport au complexe 01.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

A

- **Afnor (association Française pour la normalisation), 2000;** Huiles essentielles. Tom 1: Echantillonnage et méthodes d'analyse 471 P. Tom 2. Vol 1: Monographie Relative aux huiles essentielles. Ed. PARA Graphic, P.323.
- **Aissi O, Boussaid M, Messaoud C (2016).** Essential oil composition in natural populations of *Pistacia lentiscus* L. from Tunisia: Effect of ecological factors and incidence on antioxidant and antiacetylcholinesterase activities. *Industrial Crops and Products*, 91 : 56-65.
- **Al-saghir M.G., 2006 ;** Analysis of the Genus *Pistachia* (*Anacardiaceae*). Thèse de Doctorat en Sciences Biologique, Université Blacksburg, Virginia Faculté de Polytechnique et Phylogenetic. p. 123
- **Amirouche R., 2008 ;** Flore spontanée d'Algérie et ressources phytogénétiques : Caractérisation et stratégie de conservation Biotech 2008, X Ies Journées Scientifiques du réseau «Biotechnologies végétales /Amélioration des plantes et sécurité alimentaire» de l'Agence universitaire de la Francophonie 30 juin- 3 juillet 2008, Agrocampus Rennes, France. P.11-12.
- **Atmani D., Chaher N., Berboucha M., Ayouni K., Lounis H., Boudaoud H., Debbache N., Atmani D., 2009 ;** Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants, *112(2)*: 303–309.

B

- **Bagamboula C.F., Uyttendaele M., Debevere J., 2004 ;** Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Higella sonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbiology*. p. 33-42.

- **Barbouchi M., El Idrissi M., Choukrad M., Louzi L., 2016** ; Chemical composition And antimicrobial activity of essential oils isolated from leaves and twigs of *Pistachia lentiscus* : Growing wild in Morocco. *World journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(4) : 516-524. ISSN 2278- 4357. SJIF Impact Factor 6.041.
- **Bari M. A., Islam W., Khan A. R., Mandal A., 2010**; Antibacterial and antifungal activity of *Solanum torvum* (*Solanaceae*), *Int. Journal of Agriculture. Biology*, p. 386-390.
- **Benhammou N., 2006** ; Etude des activités antimicrobienne et antioxydant des huiles Essentielles et des composés phénolique de *Pistachia lentiscus*, *Pistachia atlantica* et *inula viscosa* de la région de Tlemcen. *Thèse de Magister, Université Aboubekr Belkaid*. P. 85-95
- **Belfadel F. Z., 2009**; Huile de fruits de *Pistachia lentiscus* : Caractéristiques physicochimiques et effets biologiques (Effet cicatrisant chez le rat), Université Mentouri Constantine Faculté des Sciences exacte Département de Chimie.
- **Benabderrahmane M., Benali M., Aouissat H., Jordan M.J., 2009**; Activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Pistachia atlantica* Desf : De l'Algérie. *Phytothérapie*, 7(6): 304-308
- **Bensegueni A., 2007** ; Les onguents traditionnels dans le traitement des plaies et des brulures. Thèse d'Etat en sciences vétérinaires, Université Mentouri Constantine. p.21-22.
- **Benzeggouta N., 2005**. Thèse Présentée en vue de l'Obtention du Diplôme de Magister en Pharmaco chimie, Etude de l'Activité Antibactérienne des Huiles Infusées de Quatre Plantes. Pp : 42-59.
- **Biondi D., Cianci P., Geraci C., Ruberto G., Piattelli M., 1993**; Antimicrobial activity and chemical composition of essential oils from *Sicilian aromatic plants*. *Flavour and Fragrance Journal*, 8(6) : 331-337 Pp.
- **Boukeloua A., 2009**; Caractérisation botanique et chimique et évaluation Pharmaco toxicologique d'une préparation topique à base d'huile de *Pistachia lentiscus*

(*Anacardiaceae*). Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Magistère, Université Mentouri Constantine

- **Bouyahya A., ChristelleChadon I., Assemian L., Mouzount H., Bourais I., Fellah H., 2019** ; Could volatile compounds from leaves and fruits of *Pistacia lentiscus* constitute a novel source of anticancer, antioxidant, antiparasitic and antibacterial drugs? ; Industrial Crops and Products Volume 128 , P 62-69
- **Boullard B., 2001**; Dictionnaire des plantes médicinales du monde: Réalités et Croyance, *Ed: Estem*. P. 414-415.
- **Bonnier G., Douin R., 1934** ; Flore complète illustrée en couleurs de France, Suisse et Belgique. Librairie Générale de l'Enseignement, Paris. 12 tommes. 120 fasc. p.721
- **Bousseboua H., 2001** ; Eléments de microbiologie générale, 32 : 160 -167 Pp.
- **Bolla J. M., 2007**; Antibacterial action of essential oils from *Corsica*. *Journal Essent Oil Res*, 19: 176-182.
- **Bouaoun D., Hila C., Garabeth F., Sfeir R., 2007**; Etude de l'activité Antimicrobienne de l'huile essentielle d'une plante sauvage *Prangos asperula boiss*. *Phytothérapie*, 5 : 129 –134 pp.
- **Bruneton J., 1993** ; Plantes médicinales, Tec Doc, Lavoisier, Paris. Pharmacognosie: Phytochimie. P.915.

D

- **Davidson P.M., 1997** ; Methods for testing the efficacy of food antimicrobial : Food Technology, 43:148-155 p.
- **D'Arrigo M., Ginestra G., Mandalari G., Furneri P. M., Bisignano G., 2011**; Synergism and post antibiotic effect of Tobramycin oil and *Melaleuca alternifolia*

(teatree) against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Phytomedicine*, 17 : 317–322.

- **Derwich E., Benziane Z., Boukir A., 2010;** Chemical composition of leaf essential oil Of *Juniperus phoenicea* and evaluation of its antibacterial activity. *International Journal of Agriculture & Biology*, 12(2) : 199-204p
- **Dogan Y., Baslar S., Aydin H., Mert H.H., 2003;** A study of the soil-plant interactions Of *Pistachia lentiscus* distributed in the westem Anatolien part of Turkey. *Acta Bot. Croat*, 62: 73-88P
- **Dorman H. J. D., Deans S. G., 2000;** Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88(2): 308-16.

F

- **Fadli M., Chevalier J., Saad A., Mezrioui N. E., Hassani L., Pages J. M., 2011;** Essential oils from Moroccan plants as potential chemosensitisers restoring antibiotic activity in resistant Gram-negative Bacteria. *Int Journal Antimicrobien Agents*, 38(4) :325-330 p.

G

- **Garnier G., Bézanger-Beauquesne L., Debraux G., 1961;** In vitro antimicrobial activity of *Pistachia lentiscus* extracts : Preliminary repor. *Journal of Chemotherapy*, 8(3): 207-209
- **Georgantelis D., Ambrosiadis I., Katikou P., Blekas G., Georgakis S A., 2007 ;** Effect of rosemary extract, chitosan and α -tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4 °C. *Meat Science*, 76: 172-181.

- **Guesmi A., Boudabous A., 2006;** Activité antimicrobienne de cinq huiles essentielles Associées dans les produits de thalassothérapie. *Revue des Régions Arides*, numéro Spécial. 224- 230 p.

H

- **Hammer K. A., Carson C. F., & Riley T. V., 1999;** Antimicrobial activity of Essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86: 985– 990.
- **Hmimsa Y., 2004 ;** L'agro biodiversité dans les agro systèmes traditionnels de montagnes: Cas du Rif marocain. Mémoire de troisième cycle, Université Abdelmalek Essaâdi Faculté des Sciences Vétérinaires, Tétouan, Maroc, 100 pp, Université Mentouri Constantine. p. 21-100.
- **Horvath G.Y., Kocsis B., Botz L., Németh J., Szabo L.G.Y., 2002 ;** Antibacterial activity of *Thymus phenols* by direct bioautography : Proceedings the 7th Hungarian Congress on Plant Physiology, S3. P03. *Acta Biologica Szegediensis*, 46(3.4); 2002: 145-146

I

- **Iserin P., 2001 ;** Larousse encyclopédie des plantes médicinales : Identification, Préparations, soins. *2nd Ed*, Dorling Kindersley Limited, Londres.

J

- **Joualt S., 2012;** La qualité des huiles essentielles et son influence sur leur efficacité et sur leur toxicité. Thèse de Doctorat d'état en Pharmacie, Université de Lorraine Faculté de Pharmacie, France. p.137

K

- **Kalemba D., Kunicka A., 2003**; Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem*, **10** : 813-829p
- **Kivçak B., Akay S., 2005** ; Quantitative determination of α -tocopherol in *Pistachia lentiscus*, and *Pistachia terebinthus* by TLC- densitometry and colorimetry.

M

- **Marouf A., Reynaud J., 2007** ; La Botanique de A à Z .DUNOD, Paris. p. 9-20-176-177.
- **Mann C.M., Cox S.D., Markham J.L., 2000** ; The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* NTCC 6749 contributes to its tolerance to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Letters in Applied Microbiology*, **30(4)** : 294-297 Pp.
- **Manou I., Bouillard L., Devleeschouwer M.J., Barel A.O., 1998** ; Evaluation of the preservative properties of *Thymus vulgaris* essential oil in topically applied formulation sunder a challenge test. *Journal of Applied Microbioly*, **84**: 368-376 p.
- **Mandalari G., D'Arrigo M., Ginestra C., Arena A., Tomaino A., Wickham M.S.J., 2007** ; Antimicrobial potential of polyphenols extracted from almond skins. *5th Ed, Churchill Livingstone, Philadelphia, PA* organe transplantation. P. 83-89
- **Mekkiou R., 2005** ; Recherche et Détermination Structurale des Métabolites Secondaires d'espèces du Genre *Genista fabaceae* ; *G. saharae* ; *G. ferox*. Thèse présentée pour obtenir le diplôme de doctorat d'état en chimie organique, Université Mentouri Constantine Faculté des Sciences Département de Chimie. Phytochimie. p.215
- **Millezi A.F., Caixeta D.S., Rossoni D.F., Cardoso M.d.G., Piccoli R.H., 2012** ; In vitro antimicrobial properties of plant essential oils *Thymus vulgaris*, *Cymbopogon*

citratus and *Laurus nobilis* against five important foodborne pathogens. *Food Science And Technology Campinas*, 32: 167-172 Pp.

R

- **Rivera N D., Obón Castro C., 1991;** La guía de incafo de las plantas utiles y venenosas de la península Iberica y baleares (excluidas medicinales) Incafo. *Ed Madrid*. p. 1257.
- **Rossi P. G., Berti L., Panighi J., Maury J., Muselli A., Rocca Serra D., Gonny M., Rosato A., Vitali C., De Laurentis N., Armenise D., Milillo M. A., 2007;** Antibacterial Effect of some essential oils administered alone or in combination with Norfloxacin. *Phytomedicine*, 14 : 727-732.
- **Rodrigues F. F. G., Costa J. G. M., Coutinho H. D. M., 2009;** Synergy effects of the antibiotics gentamicin and the essential oil of *Croton zehntneri*. *Phytomedicine*, 16(11) : 1052-1055.

S

- **Schauenberg P., Paris F., 2010 ;** Guide des plantes médicinales : Analyse, description et utilisation de 400 plantes. *Ed, Delachaux et Niestlé*. p.396.
- **Singleton P., 2005 ;** Bactériologie pour la médecine : la biologie et les biotechnologies. *Ed. DUNOD, Paris*. P. 454-522.
- **Souza E. L., Guerr N. B., Stamford T. L. M., Lima E. O., 2006;** Spices: alternative Sources of antimicrobial compounds to use in food conservation. *Rev. Bras. Farm.* p. 22-25.

- **Stéphane Caillet., Ph D., Monique Lacroix., Ph D., 1997;** INRS-Institut Armand-Frappier 531, Boul. des Prairies, H7V 1B7, Les huiles essentielles : leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire, Laval (Qc)

T

- **Traoré Y., Ouattara, K., Yéo D., Doumbia I., Coulibaly A., 2012;** Recherche des activités antifongiques et antibactériennes des feuilles d'*Annona senegalensis* Pers. (Annonaceae). *Journal of Applied biosciences*, 58 : 4234-4242.
- **Turkmen N., Velioglu Y. S., Sari F., Polat G., 2007 ;** Effect of Extraction Conditions on Measured Total Polyphenol Contents and Antioxidant and Antibacterial Activities of Black Tea. *Molecules*, 12: 484-496.

W

- **Wan J., Wilcock A., Coventry M. J., 1998;** The effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Applied Microbiology*, 84(2) : 152- 158p.
- **Wannisorn B., Jarikasem S., Siritwangchai T., Thubthimthed S., 2005;** Antibacterial properties of essential oils from Thai medicinal plants. *Fitoterapia*, 76(2) : 233-236p.

Y

- **Yilmaz E.S., Timu M., Aslim B., 2013 ;** Antimicrobial, Antioxidant Activity of the Essential Oil of Bay Laurel from Hatay, Turkey. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 16(1) : 108-116 Pp.

- **Aissi O, Boussaid M, Messaoud C (2016).** Essential oil composition in natural populations of *Pistacia lentiscus* L. from Tunisia: Effect of ecological factors and incidence on antioxidant and antiacetylcholinesterase activities. *Industrial Crops and Products*, 91 : 56-65.

ANNEX

Tableau 12 : Les structures des composés téléchargé sur PubChem..

| Code PubChem | Composés | Masse g/mol | Code PubChem | Composés | Masse g/mol |
|--------------|------------------------------|-------------|--------------|---------------------------------|-------------|
| CID 79035 | Tricyclene | 136.238 | CID 16296 | Amyl benzoate | 192.258 |
| CID 6654 | α -Pinene | 136.238 | CID 3084311 | Δ - Cadinol | 222.372 |
| CID 6616 | Camphene | 136.238 | CID 93081 | β - Cubebene | 204.357 |
| CID 14896 | β -Pinene | 136.238 | CID 15448 | 2-Undecanol | 172.312 |
| CID 31253 | Myrcene | 136.238 | CID 17129 | 2-Methylbutyl 2-methylbutanoate | 172.268 |
| CID 7460 | α -Phellandrene | 136.238 | CID 12613 | 3-Methylbutyl 3-methylbutanoate | 172.268 |
| CID 7462 | α -Terpinene | 136.238 | CID 62445 | 2-Methylbutyl 3-methylbutanoate | 172.268 |
| CID 22311 | Limonene | 136.238 | CID 13918681 | cis-Menth-2-en-1-ol | 154.253 |
| CID 5281553 | Trans - β -Ocimene | 136.238 | CID 524198 | Thuja-2,4(10)-diene | 134.222 |
| CID 7461 | Γ - Terpinene | 136.238 | CID 1252759 | α -Campholenal | 152.237 |
| CID 11463 | Terpinolene | 136.238 | CID 519323 | p-Mentha-1,5-dien-8-ol | 152.237 |
| CID 6549 | Linalol | 154.253 | CID 92874 | Verbenone | 150.221 |
| CID 5368821 | Allo-Ocimene | 136.238 | CID 94221 | trans-Carveol | 152.237 |
| CID 2537 | Camphor | 152.237 | CID 12303902 | Copaene | 204.357 |
| CID 11230 | Terpineol-4 | 154.253 | CID 5354499 | trans-Caryophyllene | 204.357 |
| CID 17100 | α - Terpeneol | 154.253 | CID 442393 | β - Selinene | 204.357 |
| CID 9895 | β -Cyclocitral | 152.237 | CID 61126 | verbenol | 152.237 |
| CID 6450832 | Vitispirane | 192.302 | CID 26049 | 3-carene | 136.238 |
| CID 6448 | Bornyl acetate | 196.29 | CID 530426 | Isoledene | 204.357 |
| CID 8163 | 2-Undecanone | 170.296 | CID 5281515 | β -caryophyllene | 204.357 |
| CID 442359 | α -Cubebene | 204.357 | CID 101716 | Globulol | 222.372 |
| CID 92042749 | α -Copaene | 204.357 | CID 11142 | β - Phellandrene | 136.238 |
| CID 62566 | β - Bourbonene | 204.357 | CID 61812 | Butyl-2-methylbutyrate | 158.241 |
| CID 6918391 | β -Elemene | 204.357 | CID 162627 | 2-Methylbutyl butyrate | 158.241 |
| CID 7127 | Methyleungenol | 178.231 | CID 442409 | α -Ylangene | 204.357 |
| CID 6450812 | β - Gurjunene | 204.357 | CID 25244198 | β -Ylangene | 204.357 |
| CID 521496 | Epi- Bicyclosesquiphellandre | 204.357 | CID 5352543 | (Z)-3-Hexenyl hexanoate | 198.306 |
| CID 5281520 | α - Humulene | 204.357 | CID 16255 | Isoamyl octanoate | 214.349 |
| CID 12306052 | α - Amorphene | 204.357 | CID 595385 | epi-Zonarene | 204.357 |
| CID 5373727 | Germacrene D | 204.357 | CID 92780 | Cryptone | 138.21 |
| CID 12306047 | α - Muurolene | 204.357 | CID 13894537 | Bicyclogermacrene | 204.357 |
| CID 6432404 | Γ - Cadinene | 204.357 | CID 85567 | cis-Piperitol | 154.253 |
| CID 441005 | Δ - Cadinene | 204.357 | CID 8500 | p-Methyl acetophenone | 134.178 |
| CID 12306048 | α - Cadinene | 204.357 | CID 10582 | Myrtenol | 152.237 |
| CID 10248 | Elemicin | 208.257 | CID 91747903 | 3,7-Guaiadiene | 204.357 |
| CID 5284507 | Nerolidol | 222.372 | CID 11622 | 2-Tridecanone | 198.35 |
| CID 160799 | T-Cadinol | 222.372 | CID 6429077 | cis-Calamenene | 202.341 |

| | | | | | |
|--------------|-----------------------------|---------|--------------|------------------------------|---------|
| CID 2345 | Benzyl benzoate | 212.248 | CID 5281519 | Germacrene-B | 204.357 |
| CID 10398656 | α -Cadinol | 222.372 | CID 14529 | p-Cymen-8-ol | 150.221 |
| CID 17868 | α -thujene | 136.238 | CID 1549778 | Geranyl acetone | 194.318 |
| CID 18818 | sabinene | 136.238 | CID 91753433 | epi-Cubebol | 220.356 |
| CID 7463 | p-cymene | 134.222 | CID 640163 | 2-Methyl butyl benzoate | 160.172 |
| CID 6429301 | Z- caryophyllene | 204.357 | CID 7193 | Isoamylbenzoate | 192.258 |
| CID 10104370 | β - bisabolene | 204.357 | CID 85669481 | 1,5-Epoxy-salvial(4)14-ene | 220.356 |
| CID 1742210 | Caryophyllene oxide | 220.356 | CID 11276107 | Cubebol | 222.372 |
| CID 22559443 | Humulene epoxide | 220.356 | CID 6429080 | Gleenol | 222.372 |
| CID 12313020 | Γ - Muurolene | 204.357 | CID 23274265 | Humulene epoxide-II | 220.356 |
| CID 23204 | α - Caryophyllene | 204.357 | CID 92138 | Elemol | 222.372 |
| CID 62385 | α -p-Dimethylstyrene | 132.206 | CID 92231 | Spathuleno | 220.356 |
| CID 13187 | 2- Nonanone | 142.242 | CID 3084331 | T-Muurolol | 222.372 |
| CID 31289 | Nonanal | 142.242 | CID 985 | Hexadecanoic acid | 256.43 |
| CID 5320250 | cis- β - Ocimene | 136.238 | CID 75554 | Pentyl isobutyrate | 158.241 |
| CID 7795 | Isoamyl butyrate | 158.241 | CID 9855795 | valencene | 204.357 |
| CID 91354 | Aromadendrene | 204.357 | CID 10910653 | Viridiflorene | 204.357 |
| CID 12367 | 2- Nonanol | 144.258 | CID 534398 | iso-Aromadendrene epoxide | 220.356 |
| CID 64685 | Borneol | 154.253 | CID 61303 | 2-pentadecanone | 226.404 |
| CID 11467 | Γ - Terpeneol | 154.253 | CID 5320249 | α - ocimene | 136.238 |
| CID 11744854 | sabinene hydrate | 154.253 | CID 7814 | Fouramine D | 108.14 |
| CID 16617 | Isomyl Hexanoate | 186.295 | CID 335 | O-cresol | 108.144 |
| CID 102855 | 2- Methylbutyl hexanoate | 186.295 | CID 15348 | 6-Amino-3-picoline | 108.144 |
| CID 111037 | α - Terpinyl acetate | 196.29 | CID 277 | Aminoformic acid | 61.04 |
| CID 342 | m-Methylphenol | 108.14 | CID 8343 | Bis (2-ethylhexyl) phthalate | 390.564 |
| CID 68146 | 3-Pentadecylphenol | 304.518 | CID 638072 | Squalene | 410.73 |
| CID 79044 | 2-carene | 136.238 | CID 564934 | longicyclene | 204.357 |
| CID 11830551 | α -himachalene | 204.357 | | | |

RESUMES

Résumé

Les plantes médicinales représentent une source inépuisable et efficaces grâce à leurs différents principes actifs notamment les huiles essentielles qui constituent une source immense de molécules bioactives, Il existe plusieurs procédés pour extraire ces huiles essentielles d'espèces végétales *Pistacia lentiscus* par: d'hydrodistillation en utilisant le dispositif de Clevenger.

Pour évaluer l'activité antibactérienne des huiles Essentielles seules et en combinaison avec les antibiotiques en utilisant deux méthodes différentes : la méthode de diffusion sur disques et la méthode de micro dilution sur deux souches bactériennes, souche à Gram positif et à Gram négatif de référence: *Listeria monocytogenes* ATCC 25922 et *Escherichia coli* ATCC 25922

Les résultats obtenue montrent que les huiles essentielles testées manifestent une bonne activité vis-à-vis *E.coli* et n'a montré aucune activité chez *L.monocytogenes*, elle est résistante vis-à-vis les huiles de *Pistachia lentiscus*

La comparaison entre les valeurs des CMI, CMB et CMB/CMI a montré que notre huile ayant un effet bactéricide chez les Gram+ et Gram-

L'association des huiles essentielles avec les antibiotiques a montré un effet antagonisme

Ces résultats nous permettent de conclure qu'on peut combiner certaines huiles avec les antibiotiques, ce qui peut réduire la dose efficace de ces derniers et minimiser leurs effets secondaires.

La partie in silico consiste à étudier les interactions entre deux molécules : un récepteur et un ligand par docking moléculaire afin de trouver la « meilleur » correspondance entre les deux , testé sur deux protéines (Pénicilline Binding Proteine a1 + Peptidoglycan glycosyltransferas) avec 129 composées des huiles essentielles de *Pistacia lentiscus* et étudier les interactions entre eux. Les résultats obtenue deux meilleurs score (Hexadecanoic acid : -6.9282 Kcal/mol avec Pénicilline Binding Proteine a1) et (Elemencin : -7.7465 Kcal/mol avec Peptidoglycan glycosyltransferas).

Mots clés : Huiles Essentielles, Antibiotiques, Combinaison, Activité antibactérienne, Antagonisme, Effet bactéricide, *Pistacia lentiscus*, Protéine , Ligand, recepteur

Abstract

Medicinal plants are an inexhaustible source and effective thanks to their different active ingredients including essential oils which constitute an immense source of bioactive molecules. There are several processes to extract these essential oils of plant species *Pistacia lentiscus* by: hydrodistillation using the Clevenger device.

To evaluate the antibacterial activity of Essential oils alone and in combination with antibiotics using two different methods: the disk diffusion method and the microdilution method on two bacterial strains, Gram-positive strain and Gram-negative reference strain: *Listeria monocytogenes* ATCC 25922 and *Escherichia coli* ATCC 25922.

The results obtained show that the essential oils tested show a good activity vis-à-vis *E. coli* and showed no activity in *L. monocytogenes*, it is resistant vis-à-vis the oil of *Pistachia lentiscus*.

The comparison between the MIC, CMB and CMB / MIC values showed that our oil had a bactericidal effect in Gram + and Gram-.

The association of essential oils with antibiotics has shown an antagonistic effect.

These results allow us to conclude that certain oils can be combined with antibiotics, which can reduce the effective dose of antibiotics and minimize their side effects.

The "in silico" part consists of studying the interactions between two molecules: a receptor and a ligand by molecular docking in order to find the "best" match between the two, tested on two proteins (Penicillin Binding Protein a1 + Peptidoglycan glycosyltransferas) with 129 composed of essential oils of *Pistacia lentiscus* and study the interactions between them. The results obtained two highest score (Hexadecanoic acid: -6.9282 Kcal / mol with Penicillin Binding Protein a1) and (Elemencin: -7.7465 Kcal / mol with Peptidoglycan glycosyltransferas).

Key words: Essential oils, Antibiotics, Combination, Antibacterial activity, Antagonism, Bactericidal effect, *Pistacia lentiscus*, Protein , Ligand, receptor.

ملخص

النباتات الطبية مصدر لا ينضب وفعال بفضل مكوناتها النشطة المختلفة بما في ذلك الزيوت الأساسية التي تشكل مصدرا هائلا للجزيئات النشطة بيولوجيا. هناك العديد من العمليات لاستخراج هذه الزيوت الأساسية من الأنواع النباتية *Pistacia lentiscus* بواسطة: hydrodillillation باستخدام جهاز Clevenger.

لتقييم النشاط المضاد للبكتيريا للزيوت الأساسية وحدها وبالاقتران مع المضادات الحيوية باستخدام طريقتين مختلفتين: طريقة نشر القرص وطريقة التخفيف الجزئي في سلالتين جرثوميتين ، سلالة إيجابية الجرام وسلالة مرجعية سالبة الجرام: *Listeria monocytogenes* ATCC 25922 و *Escherichia coli* ATCC 25922

أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن الزيوت الأساسية التي تم اختبارها تُظهر نشاطاً جيداً تجاه *E. coli* ولم تظهر أي نشاط في *L. monocytogenes* ، وهي مقاومة لزيت *Pistacia lentiscus*.

أظهرت المقارنة بين قيم MIC و CMB و MIC / CMB أن زيتنا كان له تأثير مبيد للجراثيم في + Gram و -Gram.

أظهرت العلاقة بين الزيوت الأساسية والمضادات الحيوية تأثيراً مضاداً.

تسمح لنا هذه النتائج باستنتاج أن بعض الزيوت يمكن دمجها مع المضادات الحيوية، والتي يمكن أن تقلل من الجرعة الفعالة من المضادات الحيوية وتقلل من آثارها الجانبية.

تسمح لنا الدراسة الرقمية او الدراسة باستعمال البرامج بدراسة التفاعلات بين جزئين : مستقبل و رابط من خلال الالتحام الجزيئي من أجل إيجاد "أفضل" تطابق بين الاثنين ، تم اختبارهما على بروتينين *Pénicilline Binding Proteine a1* و *Peptidoglycan glycosyltransferas* مع 129 مركب للزيت الاساسي ل *Pistacia Lentiscus* ودراسة التفاعلات بينهما ، حصلت النتائج على اعلى الدرجات لمركب (*Hexadecanoic acid* : -6.9282 Kcal/mol مع *Pénicilline* و *Elemencin* : -7.7465 Kcal/mol مع *Peptidoglycan glycosyltransferas*) و *Binding Proteine a1*

الكلمات المفتاحية: الزيوت الأساسية ، المضادات الحيوية ، الجمع ، النشاط المضاد للبكتيريا ، التناقض ، تأثير مبيد للجراثيم ، عدس الفستق، بروتين ، مستقبل ، رابط.