

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة البليدة-1
كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم البيولوجيا والفيزيولوجيا الخلوية

République Algérienne démocratique et populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et la recherche scientifique
Université de Blida-1
Faculté des sciences de la nature et de la vie
Département de biologie et physiologie cellulaire



Mémoire de fin d'étude

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master

Option : Microbiologie

Sous le thème :

Caractérisation par chromatographie/spectroscopie RMN et évaluation in-vitro et in-silico du potentiel biologique des benzimidazoles issues des réactions d'hémi-synthèse à partir des huiles essentielles

Soutenu le : 09/09/2020

Présentée par : Mlle SAMEUT Asmaâ et Mlle BOUMAZA Chaimaa

Devant le jury :

Présidente : Mme. LOUNACIL. MCB/USDB-1

Examinatrice : Mme. MEKLAT A. Professeur/USDB-1

Promoteur : Mr. ZIANI Borhane Eddine Cherif MRA/CRAPC

2019/2020

Remerciement

*Nous remercions les membres du jury pour l'intérêt porté à notre travail,
Merci à Mme Lounaci L. qui nous a fait l'honneur d'avoir bien voulu présider le
jury.*

*Merci Mme Meklat A. pour le temps que vous avez consacré à lire et examiner
notre mémoire.*

*Nos profonds remerciements s'adressent à notre cher promoteur
Dr. Ziani Borhane Eddine Cherif, merci pour l'encadrement exemplaire que
vous nous avez accordé malgré votre emploi de temps très chargé. Merci pour
votre gentillesse et vos qualités humaines. Ce travail ne serait pas ce qu'il est
sans votre aide, vos conseils, et vos précieux efforts.*

*Nous adressons également nos vifs remerciements au Professeur Bachari
Khaldoun le directeur général du centre de recherche scientifique CRAPC, pour
son accueil. Notre reconnaissance va à tous le personnel du centre qui de près
ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail.*

*Nous tenons pour cette occasion à remercier tous particulièrement nos chers
professeurs pour la qualité de l'enseignement qu'ils nous ont prodigués au
cours de ces cinq années passées à l'Université de SAAD Dahleb, Blida-1.*

Sans vous nous ne serons pas là.

*Une pensée particulière pour tous nos chers collègues de la promotion, avec qui
on a partagé trois ans pleins de beaux souvenirs. Nous souhaitons pour eux une
bonne continuation dans le cursus scientifique et la vie professionnelle.*

Merci à tous,

Dédicace

Je dédie ce modeste travail accompagné d'un profond amour :

A ma chère mère pour son amour infini, pour son soutien incorporable, pour sa compréhension qui n'a pas d'équivalent, pour ses sacrifices tout au long de mon parcours scolaire, avec mes sentiments d'amour et de respect les plus chaleureux.

A la mémoire de mon cher père que je l'ai perdu très tôt, et qui j'aurai bien aimé qu'il soit à mes côtés dans ces moments inoubliables. Que dieu bénisse ton âme mon père.

A mes chère frères Abderrahmane, Réda, Aymen et Imad qui m'avez toujours soutenu et encouragé durant ces années d'étude.

A ma belle-sœur Nasira et mon cher petit neveu Ahmed.

A la mémoire de mes grands-pères et grandes mères.

A mes amies les plus chères Aida, Khouloud, Hanene et Abir, ma source d'espoir, de joie et de motivation.

A mes chères cousines Fella, Sarah, Meriem, Lidia, Sirine, Rym, Yesmine et Ahlem, pour leur amour et leurs encouragements.

A mes oncles et tantes et toute la famille BOUMAZA et BENZERIGA pour leur amour et leur soutien.

Sans oublier ma chère amie Asma avant d'être mon binôme pour sa patience, son soutien moral et sa compréhension tout au long de ce projet.

Chaimaa,

Dédicace

Je dédie ce modeste travail avec les sentiments d'amour et de gratitude :

À mes très chers parents, ceux à qui je dois toute ma vie et mes réussites,

A mes très chères grandes mères la source d'amour et d'affection,

À mon très cher frère Amine, ma belle-sœur Leila et ma nièce Oumnia

A mon frère Louai et mes sœurs Chaimaâ, Aya et Walaâ.

A toute ma famille, mes cousins et cousines

A mes chers oncles Smaine, Mahfoud, Brahime et mes tantes Safia, Amina, et Ratiba.

Merci pour votre amour et encouragement.

A mes chères amies, Fatima, Nariman et Asma.

A mon binôme et chère amie Chaima, qui m'as accompagnée tous au long de ces cinq années universitaires. Les moments et les souvenirs qu'on a ensemble je ne les oublierais jamais. Merci de m'avoir apporté la joie au quotidien.

Je profite de l'occasion pour exprimer ma sincère gratitude à Mr. Aouni Djamel, qui m'a permis de bénéficier d'une longue période de stage au sein du laboratoire central de l'hôpital de Koléa, durant laquelle j'ai pu enrichi mon expérience en bactériologie clinique.

Je remercie tout particulièrement Mr. Zaibek Toufik et Mme khireddine Djamilia, qui m'ont aidé le plus. Merci pour vos qualités humaines, votre professionnalisme, vos précieux conseils et vos efforts volontaires pour nous assurer la meilleure formation possible.

Sans que j'oublie mes chers collègues et amis, Mohamed, Ahlem, Sidali, Zehor, Chaima et toute personne que j'ai eu la chance de rencontré pendant mon stage. Merci pour l'ambiance amicale, les repas partagés ensemble, les moments de folie et les beaux souvenirs.

Asma,

Liste des figures

Figure 1. Structure chimique des phénols simples (a), acide hydroxybenzoïque (b), acides hydroxycinnamiques (c).....	5
Figure 2. Structure chimique des principales classes des flavonoides	6
Figure 3. Structure chimique de l'acide gallique (a), d'un tannin hydroxysable, et le pentagalloylglucose (polymère forme de glucose et de 5 unités de glucose) (b), et l'acide ellagique (c).....	7
Figure 4. Structure de base des tannins condensés.....	7
Figure 5. Schéma représentatif de l'installation du système de chromatographie CPG.....	11
Figure 6. Schéma du principe de la chromatographie HPLC	12
Figure 8. Structure chimique du taxol (1), taxotère (2) et la 10-deacetyl-baccatineiii(dab) (3)	16
Figure 9. Hémi-synthèse de la dihydrostreptomycine	17
Figure 10. Exemple de molécules biologiquement actives contenant le motif benzimidazole	19
Figure 11. Structure chimique du noyau benzimidazole.	20
Figure 12. Synthèse de 2,5 (2,6) diméthylbenzimidazole	20
Figure 13. Synthèse de benzimidazoles à partir de l'OPA et de dérivés du DMF en présence de PHSiH ₃	21
Figure 14. Synthèse de benzimidazoles à partir de 3,5-dichloro-1,2-diamine et des aryl- aldehydes	21
Figure 15. Synthèse des dérivés 2-aminobenzimidazoles cyano, méthyl et nitro-substitués	22
Figure 16. Synthèse des dérivés benzimidazol- hydrazones	22
Figure 17. Synthèse des dérivés benzimidazole-2-one et benzimidazole-2- thiones.....	23
Figure 18. Alkylation de benzimidazole-2-one et benzimidazole-2-thiones	23
Figure 19. Synthèse des dérivés 5-nitro-substitués de benzimidazoles	24
Figure 20. Médicaments antiviraux à base de benzimidazoles.....	25
Figure 21. Le dérivé 4-51,3-diméthyl-2,3-dihydro-1hbenzimidazole-2-yle)phenol.....	27
Figure 22. Structure chimique de l'AHL et ses analogues de la classe des benzimidazoles.....	27
Figure 23. Les dérivés benzimidazoles à activité antibactérienne prometteuse d'après les études SAR	28
Figure 24. Les dérivés benzimidazoles à activité antifongique prometteuse d'après les études SAR	28
Figure 25. Structure de base des dérivés n-(1h-benzimidazol-2yl-méthyl)-5,6,7,8-tetrahydro-8-quinolinamine à activité anti-HIV	29
Figure 26. La procédure typique du docking moléculaire.....	32
Figure 27. Structure chimique de la cinnamaldéhyde	37
Figure 28. <i>Cymbopogon citratus</i> avec ses longues feuilles	38
Figure 29. Structure chimique du citral.....	38
Figure 30. Hydrodistillateur en type cleverger en système fermé	39
Figure 31. Représentation du noyau benzimidazole.....	41
Figure 32. Chromatographie sur colonne	44
Figure 33. Réaction de test DPPH (2,2 diphenyl 1 picrylhydrazyl)	47
Figure 34. Schéma de la réaction de réduction de fer	48
Figure 35. Test de l'acide 2-thiobarbiturique.....	49
Figure 36. Structure et spectre RMN ¹ H du 2-(1h-1,3-benzodiazol-2-yl) phenol (1b).....	57
Figure 37. Structure et spectre RMN ¹ H du 2-[(1e)-2-phenylethényl]-1h-1,3 benzodiazole (2b).....	58
Figure 38. Structure et spectre RMN ¹ H du 2- [(1e)-2,6-diméthylhepta-1,5-dien-1-yl]-1h-1,3-benzodiazole (3b)	59
Figure 39. Résultats de l'activité antioxydante	61

Liste des tableaux

Table I. Liste des produits chimiques utilisés.....	35
Tableau II. Classification de la cannelle	36
Tableau III. Classification de la citronnelle.....	37
Tableau IV. Composition chimique de l'HE de la cannelle	53
Tableau V. Composition chimique de l'HE de la citronnelle	53
Tableau VI. Résultats de l'activité antibactérienne	60
Tableau VII. Prédiction du docking 4QGH/1b montrant les valeurs des clusters et deltaG	63
Tableau VIII. Prédiction du docking 4QGH/2b montrant les valeurs des clusters et deltaG	64

Glossaire

Base de Schiff : Une base de Schiff, nommé d'après Hugo Schiff, est un composé comportant une double liaison C=N avec l'atome d'azote lié à un groupe aryle ou alkyle, et pas un hydrogène : ce sont donc les imines secondaires.

Pose : Conformation et position d'un ligand au sein du site actif d'une protéine. Autrement dit l'agencement 3D d'un composé dans un complexe.

Score : le score est une donnée numérique utile pour quantifier le degré avec lequel un ligand se complexe à un récepteur.

Pharmacophore : Une partie d'une structure moléculaire qui est responsable d'une interaction biologique ou pharmacologique particulière. Servant de modèle pour la création de nouveaux médicaments.

Hits : En chimie médicinale les hits désignent au sein de la chimiothèque tester par ciblage,

l'ensemble des substances actives sur la cible étudiée, d'une façon appropriée (activation/inhibition).

Chimiothèque : Une chimiothèque est une banque de données de molécule. Les chimiothèques peuvent contenir de plusieurs dizaines à plusieurs millions de composés chimiques.

Leads : les molécules leads (têtes de série) sont les molécules candidats, ayant un fort potentiel thérapeutique et dont l'activité sur la cible et leur comportement in vivo (toxicité, biodisponibilité, etc.) ont été optimisés par modélisation moléculaire.

Le profil ADME-tox : Le profil ADME-tox d'une molécule est l'ensemble des paramètres caractérisant sa biodisponibilité dans l'organisme, c'est à dire, son absorption, sa distribution, son métabolisme, son excrétion et sa toxicité.

Liste d'abréviations

ADME-tox : Administration-Distribution-Métabolisme-Excrétion-toxicity

AHL : Acyl-homosérine lactone

antiTB : Antituberculeuse

ATB : Antibiotique

ATCC : American type culture collection

CCM : Chromatographie sur couche mince

CMI : concentration minimale inhibitrice

CPG : Chromatographie en phase gazeuse

CV : Criblage virtuel

DAB : 10-déacétyl-baccatine III

DMF : N,Ndiméthylformamide

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DPPH : 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyle
III

FAS : Fatty acid synthase

FID : Détecteur à ionisation de flamme

FtsZ : Filamentous temperature sensitive mutant Z

GC/MS : Gaz chromatography /mass spectrometry

HE : Huile essentielle

HPLC : High performance liquid chromatography

LCMS : Liquid chromatography mass spectrometry

MDR : Multi-Drug-Resistant

MHB : Muller hinton broth

MS : Masse spectroscopy

OPA : Orthophénylendiamine

PPI : *Proton-pump inhibitor*

QS : Quorum sensing

RMN : Résonance magnétique nucléaire

ROS : Reactive oxygen species

SAR : Structure activity relationship

SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline

TBARS : Thiobarbituricacid réaction substance

TCD : Détecteur à conductibilité thermique

TDR : Totally-drug-resistant

TSB : Tryptone soya broth

Résumé

La synthèse de nouveaux dérivés 2-substitués de benzimidazole et l'évaluation de leur activités antimicrobienne et antioxydante étaient l'objectif principal de ce travail. Les composés 1b (2-(1*H*-1,3-benzodiazol-2-yl) phenol), 2b (2-[(1*E*)-2-phenylethenyl]-1*H*-1,3-benzodiazole) et 3b (2-[(1*E*)-2,6-dimethylhepta-1,5-dien-1-yl]-1*H*-1,3-benzodiazole) ont été synthétisés en réagissant l'*o*-phénylènediamine avec la salicylaldéhyde, la cinnamaldéhyde et le citral (respectivement). La structure des composés a été élucidée par spectroscopie RMN ¹H. Les composés 1b-3b ont été analysés pour leur activité antioxydante à l'aide de quatre essais *in vitro* complémentaires : le test au DPPH, le pouvoir réducteur du fer, l'inhibition du blanchissement du β-carotène, et l'inhibition de la formation de TBARS. Tous les composés testés ont montré une activité antioxydante avec des performances différentes. L'activité antimicrobienne a été étudiée contre des souches ATTC (trois bactéries à Gram- : *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, and *Pseudomonas aeruginosa*, une bactérie à Gram+ : *Staphylococcus aureus*, et la levure *Candida albicans*). Le composé 1b a montré la plus forte activité contre *S.aureus* et *C.albicans* (CMI <0.3125 mg/mL), suivait de *E.coli* and *S.typhi* (CMI = 0.3125 mg/mL), et *P. aeruginosa* (CMI = 0.625 mg/mL). Les composés 2b et 3b ont démontré des valeurs de CMI assez similaires, et ils se sont avérés moins actifs contre *P. aeruginosa* (CMI 1,5 and 2.5 mg/mL, respectivement). Pour une étude plus approfondie, le docking moléculaire a été procédé par le logiciel AutoDOCK.

Mots clés : benzimidazole, RMN, activité antimicrobienne, activité antioxydante, docking moléculaire

Abstract

The synthesis of some new 2-substituted benzimidazole derivatives and investigation of their antimicrobial and antioxidant activities were the aims of this work. Compounds 1b (2-(1*H*-1,3-benzodiazol-2-yl) phenol), 2b (2-[(1*E*)-2-phenylethenyl]-1*H*-1,3-benzodiazole) and 3b (2-[(1*E*)-2,6-dimethylhepta-1,5-dien-1-yl]-1*H*-1,3-benzodiazole) were synthesized by reacting *o*-phenylenediamine with salicylaldehyde, cinnamaldehyde, and citral (respectively). Structure elucidation of the final compounds was achieved by ¹H NMR spectroscopy. Compounds 1b-3b were screened for their antioxidant activity by using four complementary in vitro assays: DPPH test, iron reducing power, β-carotene bleaching inhibition and TBARS formation inhibition. All the tested compounds showed antioxidant activity with different performances. Antimicrobial activity was investigated against ATCC strains (three Gram- bacteria: *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, and *Pseudomonas aeruginosa*, one Gram+ bacteria: *Staphylococcus aureus*, and the yeast *Candida albicans*). compound 1b showed the highest potential against *S.aureus* et *C.albicans* (CMI <0.3125 mg/mL), followed by *E.coli* and *S.typhi* (CMI = 0.3125mg/mL), and *P. aeruginosa* (CMI = 0.625 mg/mL).Compounds 2b 3b demonstrated a quite similar CMI values, and they have been found to be less active against *P. aeruginosa* (CMI 1,5 and 2.5 mg/mL, respectively). For further investigation, molecular docking was proceeded by using AutoDOCK software.

Keywords: benzimidazole, NMR, antimicrobial activity, antioxidant activity, molecular doking.

ملخص

الهدف الأساسي لهذا العمل هو إنتاج مركبات كيميائية جديدة مشتقة من البنزيميدازول والتحقق من فعاليتها كمضادات حيوية ومضادات للأكسدة. لقد تم إنتاج المركبات 1b (2-(1H-1,3-benzodiazol-2-yl) phenol), 2b (2-[(1E)-2-phenylethenyl]-1H-1,3-benzodiazole), 3b (2-[(1E)-2,6-dimethylhepta-1,5-dien-1-yl]-1H-1,3-benzodiazole) من خلال تفاعل ثنائي الأمين العطري " مع الألدهيد الساليسيليك، الألدهيد السيناميك و السيترال (على التوالي). ولقد تمت دراسة التكوين الهيكلي للمركبات النهائية باستخدام تقنية تحليل مطيافية الرنين المغناطيسي النووي. تمت دراسة الفعالية المضادة للأكسدة للمركبات 1b-3b باستخدام أربعة تحاليل مخبرية تكميلية: اختبار (DPPH)، القدرة الاختزالية للحديد، تثبيط تبييض البيتاكاروتين، تثبيط تكوّن حمض ثيوبيرياريوريك. حيث أظهرت كل المركبات التي تم اختبارها نشاط مضاد للأكسدة بفعالية متباينة. ولقد تمت دراسة الفعالية المضادة الحيوية ضد سلالات ATCC (ثلاث بكتيريا سالبة الجرام *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*; بكتيريا موجبة الجرام *Staphylococcus aureus*: و الخميرة *Candida albicans*). المركب 1b كان الأكثر فعالية ضد *S. aureus* و *C. albicans* (التركيز الأدنى المثبط أكبر من 0.3125 مغ/مل). تليهم *E. coli* و *S. Typhi* بالتركيز الأدنى المثبط يعادل 0.3125 مغ/مل و 0.625 مغ/مل على التوالي). كما أظهرت المركبتان 2b و 3b قيم مماثلة إلى حد كبير، إلا أنها كانت أقل نشاطا ضد *P. aeruginosa* (نسبة التركيز الأدنى المثبط تعادل 2.5 مغ/مل و 1.5 مغ/مل على التوالي). ودراسة معمقة تم إجراء اختبار الإلتحام الجزيئي باستخدام برنامج AutoDOCK.

الكلمات المفتاحية: البنزيميدازول، مطيافية الرنين المغناطيسي النووي، الفعالية المضادة الحيوي، نشاط مضاد للأكسدة، الإلتحام الجزيئي.

Tables de matière

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Glossaire

Résumé

Introduction générale.....1

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I. LES COMPOSES BIOACTIFS DES PLANTES

1	INTRODUCTION	2
2	LES METABOLITES SECONDAIRES D'ORIGINE VEGETALE	2
3	STRUCTURE ET COMPOSITION CHIMIQUE	3
3.1	LES COMPOSES VOLATILES.....	3
3.1.1	<i>Les arômes.....</i>	3
3.1.2	<i>Les huiles essentielles (HE).....</i>	3
3.2	LES COMPOSES PHENOLIQUES	4
4	METHODES D'EXTRACTION ET PURIFICATION.....	8
4.1	L'HYDRODISTILLATION	8
4.2	L'EXTRACTION PAR SOLVANTS ORGANIQUES	8
4.3	L'EXTRACTION PAR LE CO ₂ SUPERCRITIQUE	8
5	CARACTERISATION PHYSICOCHIMIQUE	9
6	ANALYSES CHIMIQUES ET DOSAGE.....	9
6.1	ANALYSES CHROMATOGRAPHIQUES	9
6.1.1	<i>Chromatographie sur couche mince CCM.....</i>	9
6.1.2	<i>Chromatographie en phase gazeuse et chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse (GC/MS).....</i>	10
6.1.3	<i>Chromatographie liquide haute performance HPLC et LCMS.....</i>	11
6.2	METHODES SPECTRALES	12
6.2.1	<i>Spectrométrie de masse MS.....</i>	12
6.2.2	<i>Résonance magnétique nucléaire RMN.....</i>	13
7	ACTIVITES BIOLOGIQUES DES COMPOSES BIOACTIFS.....	13
7.1	ACTIVITE ANTIOXYDANTE.....	13
7.2	ACTIVITE ANTIBIOTIQUE	13
8	INTERET INDUSTRIEL	14

CHAPITRE II. HEMISYNTHESE DE MOLECULE BIOLOGIQUEMENT ACTIVE

1	INTRODUCTION	15
2	PRINCIPE DE L'HEMI-SYNTHESE	15
3	LA PLACE DE L'HEMI-SYNTHESE EN PHARMACIE	15
4	REACTIVITES DES ALDEHYDES AVEC LES COMPOSES HETEROCYCLIQUES ..	17
4.1	REACTION AVEC L'ORTHO-PHYLENEDIAMINE	18
4.2	REACTION AVEC LE METHANEDIAMINE	18

CHAPITRE III. DERIVES BENZIMIDAZOLES

1	INTRODUCTION	19
2	PROPRIETES STRUCTURALES	20
3	REACTIONS ET MECANISMES DE SYNTHSE	20
4	INTERET THERAPEUTIQUE	24
5	ACTIVITE ANTIBIOTIQUE	24
6	EFFET ANTIBACTERIEN AU NIVEAU MOLECULAIRE	26
7	RELATION STRUCTURE/ACTIVITE DES BENZIMIDAZOLES	28

CHAPITRE IV. LES TECHNIQUES BIOINFORMATIQUES DE DOCKING MOLECULAIRE

1	INTRODUCTION	30
2	LE CRIBLAGE VIRTUEL	30
2.1	LE PRINCIPE	30
2.2	LES DIFFERENTES STRATEGIES DU CRIBLAGE VIRTUEL	31
3	LE DOCKING MOLECULAIRE	32
3.1	LE PRINCIPE	32
3.2	REPRESENTATION GENERALE DU SYSTEME DE DOCKING MOLECULAIRE	32
3.3	LA RECHERCHE DE LA POSE OPTIMALE	33
3.4	L'EVALUATION DU SCORE DES POSES	34

MATERIEL ET METHODES

1	MATERIEL	35
1.1	SOLVANTS ET REACTIFS CHIMIQUE	35

1.2	MATERIEL BIOLOGIQUE	36
1.2.1	<i>La cannelle</i>	36
1.2.2	<i>La citronnelle</i>	37
2	METHODES	38
2.1	EXTRACTION DE L'HUILE ESSENTIELLE	38
2.2	ANALYSES GC-MS	39
2.3	SYNTHESE DE TROIS DERIVES 2-SUBSTITUES-1H-BENZIMIDAZOLE	40
2.4	FRACTIONNEMENT ET PURIFICATION	43
2.4.1	<i>Chromatographie sur colonne</i>	43
2.5	ANALYSE STRUCTURALE	45
2.5.1	<i>Analyse par RMN 1H proton</i>	45
2.6	ÉVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE	45
2.7	ÉVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE	49
2.7.1	<i>Microorganismes et conditions de culture</i>	49
2.7.2	<i>Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)</i>	49
2.8	LE DOCKING	50
2.8.1	<i>AutoDock</i>	50
2.8.2	<i>Étapes AutoDock</i>	50
2.8.3	<i>Protéine choisie pour le Docking-La thymidylate kinase (TMK)-</i>	51

RESULTATS ET DISCUSSION

1	PROFILE GCMS DE L'HUILE ESSENTIELLE DE LA CANNELLE	52
2	HEMI-SYNTHESE DES MOLECULES A NOUVEAU BENZIMIDAZOLE	55
3	CARACTERISATION RMN¹H	56
4	RESULTATS DES ACTIVITES BIOLOGIQUES	58
4.1	<i>ACTIVITE ANTIOXYDANTE</i>	59
4.2	<i>ACTIVITE ANTIBACTERIENNE</i>	60
5	LES RESULTATS DU DOCKING	62
5.1	<i>DOCKING DU COMPOSE 1B :2-(1H-1,3-BENZODIAZOL-2-YL) PHENOL AVEC LA PROTEIN4QGH</i>	62
5.2	<i>DOCKING DU COMPOSE 2B :2-(1E)-2-PHENYLETHENYL]-1H-1,3-BENZODIAZOLE AVEC LA PROTEIN4QGH</i>	64
	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	66

Introduction

Introduction

Introduction générale

La recherche de composés biologiquement actifs pour usage clinique de large spectre en est incitée par la nécessité de nouveaux traitements pour les maladies infectieuses, qui enregistrent une croissance remarquable, causées par la contamination par des souches multi-résistantes aux médicaments (MDR : *Multi-Drug-Resistant* et TDR : *Totally-drug-resistant*). La résistance bactérienne a diminué énormément l'efficacité de la majorité des traitements disponible à l'heure actuel, et un nombre croissant de maladies sont devenues plus difficile à traités (**Ziani et al., 2017**). Les produits naturels d'origine végétale, de part de leur grande diversité chimique, offrent des possibilités illimitées de découvertes de nouveaux médicaments. Leur potentiel biologique est notamment lié aux propriétés antioxydante, (**Benhammou et al., 2009 ; Hadri Ghembaza, 2015**), antimicrobienne (**Adnan et al., 2019 ; Ebenzer et al., 2017**), anticancéreuse (**Guimarães et al., 2014**). Par ailleurs, ils peuvent bien être utilisés par les procédés d'hémi-synthèse afin de développer de nouvelles molécules bioactives ciblant une activité biologique ou un ensemble de cibles. Cependant, les dérivés du benzimidazole, représentent une classe de composés hétérocycliques d'un grand intérêt en chimie médicinales, en raison de la grande diversité des propriétés biologiques qu'ils peuvent présentés (antibactérienne, antivirale, antioxydante, anticancéreuse, anti-inflammatoire...etc.) (**Saber et al., 2019**). Pareillement, l'avancée de la bio-informatique a beaucoup aider les scientifiques à prédire les interactions moléculaires qui détiennent une protéine et un ligand dans le site de liaison. Le docking des petites molécules et le criblage virtuel de composés candidats, sont devenus une partie intégrante dans le domaine biomédical et la conception de médicaments. Plusieurs logiciels ont été cependant développés pour fournir une procédure pour répondre à ces objectifs (**Lagarde, 2004 ; Beautrait, 2008**).

Lors de cette étude, on a visé les points de recherche suivants :

- L'extraction des huiles essentielles de la cannelle (*Cinnamomum verum*) et la citronnelle (*Cymbopogon citratus*), et leur caractérisation physicochimique par chromatographie gazeuse couplée à la spectroscopie de masse GCMS.
- L'hémi-synthèse de nouveaux dérivés 2-substitués du benzimidazoles, et analyse structurale des composé synthétisés par RMN du ¹H.
- L'évaluation de l'activité antioxydante, et antibiotique par des test *in-vitro*.
- Le docking de la protéine 4QGH (La thymidylate kinase TMK du *Staphylococcus aureus*) avec deux molécules de synthèse et hémi-synthèse.

Synthèse bibliographique
Synthèse bibliographique

Chapitre I. Les Composés Bioactifs des Plantes

1 Introduction

L'utilisation des plantes médicinales à des fins thérapeutiques est une pratique connue depuis les civilisations les plus antiques de l'évolution humaine. D'autant que la nature a toujours représenté une source inépuisable de solutions à de nombreux problèmes liés à la santé humaine. Cependant, les propriétés thérapeutiques des biomolécules d'origine végétale ou autrement appelés « les métabolites secondaires » sont dues à la leur diversité structurale.

Les progrès scientifiques en phytochimie, chimie organique et chimie analytique notamment dans le domaine de la chromatographie et le développement des méthodes analytiques spectrométriques au cours de la dernière décennie, ont permis l'avancement rapide des travaux de recherche consacrés à la validation scientifique des propriétés thérapeutiques des plantes médicinales utilisées traditionnellement en phytothérapie, et leurs compositions chimiques (**Fleurentin et al., 2002**). La reconnaissance de leurs propriétés biologiques et leur faible toxicité par rapport au médicament synthétique a encouragé les chercheurs à explorer de plus près le monde végétal dans l'espoir de trouver plus de molécules actives ou de matières premières pour l'hémi-synthèse.

2 Les métabolites secondaires d'origine végétale

En physiologie végétale, les réactions chimiques au milieu cellulaire donnent naissance à deux types de molécules chimiques appelées encore métabolites : Les métabolites primaires et secondaires. Les métabolites primaires sont classés en 4 grandes catégories : *les acides aminés, les lipides, les glucides et les acides nucléiques* (**Macheix et al., 2005**). Ces composés organiques sont indispensables à la survie du végétal ; ils sont impliqués dans des processus physiologiques fondamentaux qui assurent la croissance, le développement et la reproduction normale de l'organisme (**Hounsome et al., 2008**). Cependant, les métabolites secondaires ne participent pas directement au développement du végétal, mais plutôt ils assurent des fonctions clés dans l'adaptation de l'espèce végétale dans son environnement ; ils constituent un système de défense et de résistance face au stress biotique (phytopathogènes, herbivores...), et abiotique (exposition au rayonnement, changements climatiques...) (**Ejaz et al., 2017 ; Macheix et al., 2005**). Ces métabolites bioactifs agissent également comme agents alléopathiques contre d'autres plantes pour conquérir l'espace et les ressources nutritives et dans l'attraction des pollinisateurs ou disséminateurs (**Hounsome et al., 2008**). Il semble

par ailleurs qu'ils sont utiles en améliorant l'efficacité de la reproduction, en stimulant la croissance des feuilles, l'allongement de la tige ou la floraison. Ils interviennent aussi dans le maintien de la structure et la rigidité de la plante qui assure une protection contre l'agression physique (Macheix et al., 2005). Certains sont impliqués dans la photosynthèse et l'aspect coloré de la plante et d'autres sont responsables des arômes et parfums caractéristiques de chaque espèce (Magnard et al., 2015). On recense à l'heure actuelle plus d'une centaine de milliers de métabolites secondaires dans le règne végétal qui sont classés dans trois grandes familles chimiques : *les composés phénoliques, les terpènes et les alcaloïdes* (Macheix et al., 2005).

3 Structure et composition chimique

3.1 Les composés volatiles

3.1.1 Les arômes

Les arômes sont des composés organiques volatiles de faibles poids moléculaire, solubles dans l'eau et les lipides (Mnayer et al., 2014) ; ils sont responsables de goût et d'odeurs caractéristiques des denrées alimentaires ; ils sont généralement présents en faible concentration dans les fruits, légumes...etc. à l'exception des épices et des aromates où leur concentration peut être très élevée. Une grande variété de molécules chimiques rentre dans la composition d'un arôme, à savoir : *cétones, aldéhydes, alcools, esters, terpènes, lactones, acides*...etc. parmi les arômes les plus connus on peut citer la *vanilline, l'eugénol, l'anéthole, l'estragole* et bien d'autres.

Selon les procédés d'extraction, plusieurs types d'arômes peuvent être obtenus à partir des plantes : les huiles essentielles, les concrètes, les absolues ...etc. (Mnayer et al., 2014).

3.1.2 Les huiles essentielles (HE)

Selon la réglementation de la Pharmacopée européenne, une HE s'obtient par des procédés d'extraction mécanique : par entraînement à la vapeur d'eau ou par distillation sèche, à partir d'une matière végétale aromatique botaniquement bien définie (Couic-Marinier, 2018 ; Guerriaud, 2018). Chimiquement, ce sont des substances odorantes volatiles d'aspect huileux secrétés par les plantes aromatiques. Elles ne se dissolvent pas dans l'eau, par contre ils sont très solubles dans la majorité des solvants organiques (Couic-Marinier, 2018). Elles sont largement utilisées en aromathérapie (du latin aroma : arôme, et thérapia : traitement) pour soigner et soulager divers troubles physiologiques et psychiques (Lardry, 2007). La composition chimique des HEs est assez complexe, les composés

terpéniques (monoterpènes et sesquiterpènes) sont souvent constituants majoritaires (**Mnayer et al., 2014**). On y trouve également et selon l'espèce végétale, les cétones, les aldéhydes, les oxydes, les phénols, les éthers, les lactones, les coumarines...etc. (**Couic-Marinier et al., 2013**).

3.2 Les composés phénoliques

Les composés phénoliques sont des composés aromatiques constitués d'un ou plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles libres ou engagées dans une autre fonction chimique (ester, méthylique, éther, sucre...) (**Balasundram et al., 2006**). Chez les espèces végétales ils sont impliqués essentiellement dans des interactions écologiques biotiques et abiotiques et assurent l'adaptation et la persistance de l'espèce végétale dans son environnement (**Benhamou et al., 2012**). Ils sont mis en valeur dans l'industrie agro-alimentaire où ils jouent un rôle important dans les qualités organoleptiques et nutritionnelles des comestibles (**Fleuriet et al., 1996**). D'autre part, ces molécules et en relation avec leur configuration structurale présentent plusieurs propriétés biologiques telles que l'activité antioxydante, anti-inflammatoire, antimicrobienne, antiallergique...etc. (**Balasundram et al., 2006**). Cependant, il est à noter que, les composés phénoliques regroupent plus de 8000 espèces chimiques, classées en environ une dizaine de classes selon la complexité de leur structure chimique (**Beta et al., 2005**) :

- **Les phénols simples** : ce sont des composés rares dans la nature, leur squelette est formé d'un cycle à 6 atomes de carbone portant une fonction hydroxyle (fig.1), exemple : phénol, crésol, thymol (**Santhakumar et al., 2018**).
- **Les acides phénoliques** : ce sont principalement des dérivés de l'acide benzoïque et de l'acide cinnamique (**Santhakumar et al., 2018**) :
 - **Acides hydroxybenzoïques** : avec une structure de base C₆-C₁, ils dérivent de l'acide benzoïque par hydroxylation. Ils sont principalement représentés par l'acide gallique, l'acide vanillique, l'acide syringique, et bien d'autre (fig. 1).
 - **Acides hydroxycinnamiques** : les acides hydroxycinnamiques dérivent de de l'acide cinnamique par hydroxylation, avec une structure de base C₆-C₃ (ex : l'acide caféique, l'acide coumarique, l'acide ferulique... etc. (fig.1).

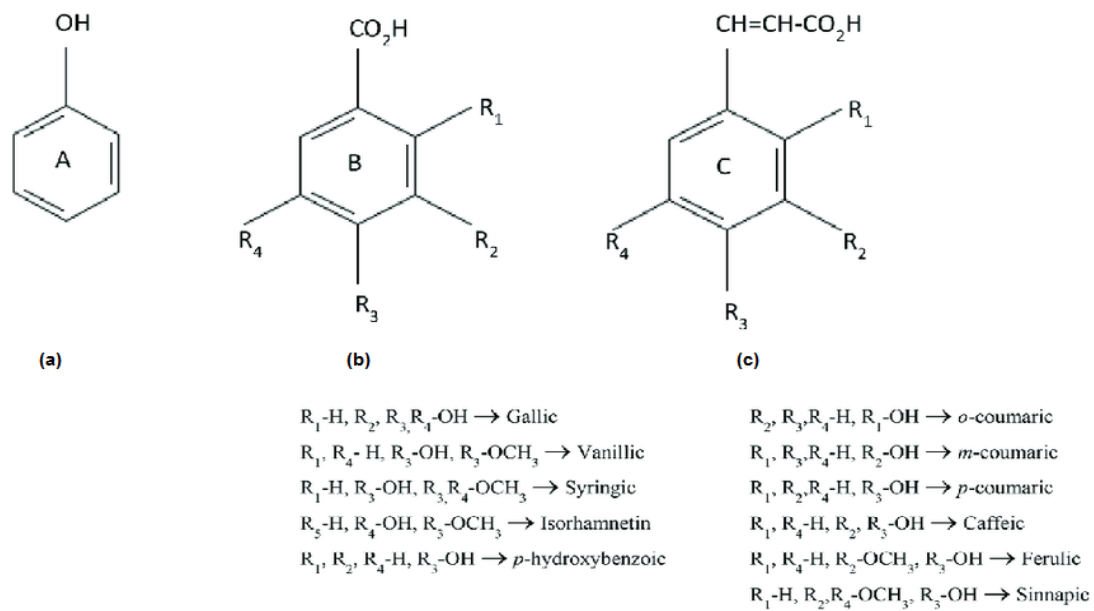


Figure 1. Structure chimique des phénols simples (a), acide hydroxybenzoïque (b), acides hydroxycinnamiques (c) (Santhakumar et al., 2018).

- **Les flavonoïdes :** Les flavonoïdes sont des pigments très répandus dans le règne végétal responsables de la coloration des fruits, fleurs et les feuilles. Ils participent souvent dans l'attraction des pollinisateurs et la protection contre les rayonnements solaires, et les attaques par les herbivores et les phytopathogènes (Ejaz et al., 2017). Plus de 4000 flavonoïdes ont été identifiés ils dérivent tous de la même voie de biosynthèse avec un précurseur commun : le noyau flavone ou 2-phenyl chromone (Benhammou, 2011). Donc sur le plan structural ils possèdent tous un squelette de base à quinze atomes de carbone, constitué de deux cycles benzéniques et d'un hétérocycle oxygéné (C₆-C₃-C₆) (Macheix et al., 2005 ; Santhakumar et al., 2018 ; Urquiga et al., 2000).

On peut distinguer notamment parmi les flavonoïdes : les flavanols, les flavones, les flavanones, les isoflavones, les anthocyanines et bien d'autres (Macheix et al., 2005). Les composés de chaque classe se distinguent par le nombre, la position et la nature des substituants sur les cycles benzéniques et la chaîne intermédiaire C₃ (fig.2). Dans la nature ils se représentent souvent sous forme glycosylée dont au moins une fonction hydroxyle lie un sucre, le plus souvent le glucose, bien que le galactose, le rhamnose, le xylose et l'arabinose, ainsi que des disaccharides tels que la rutinose peuvent être impliqués (Santhakumar et al., 2018 ; Urquiga et al., 2000).

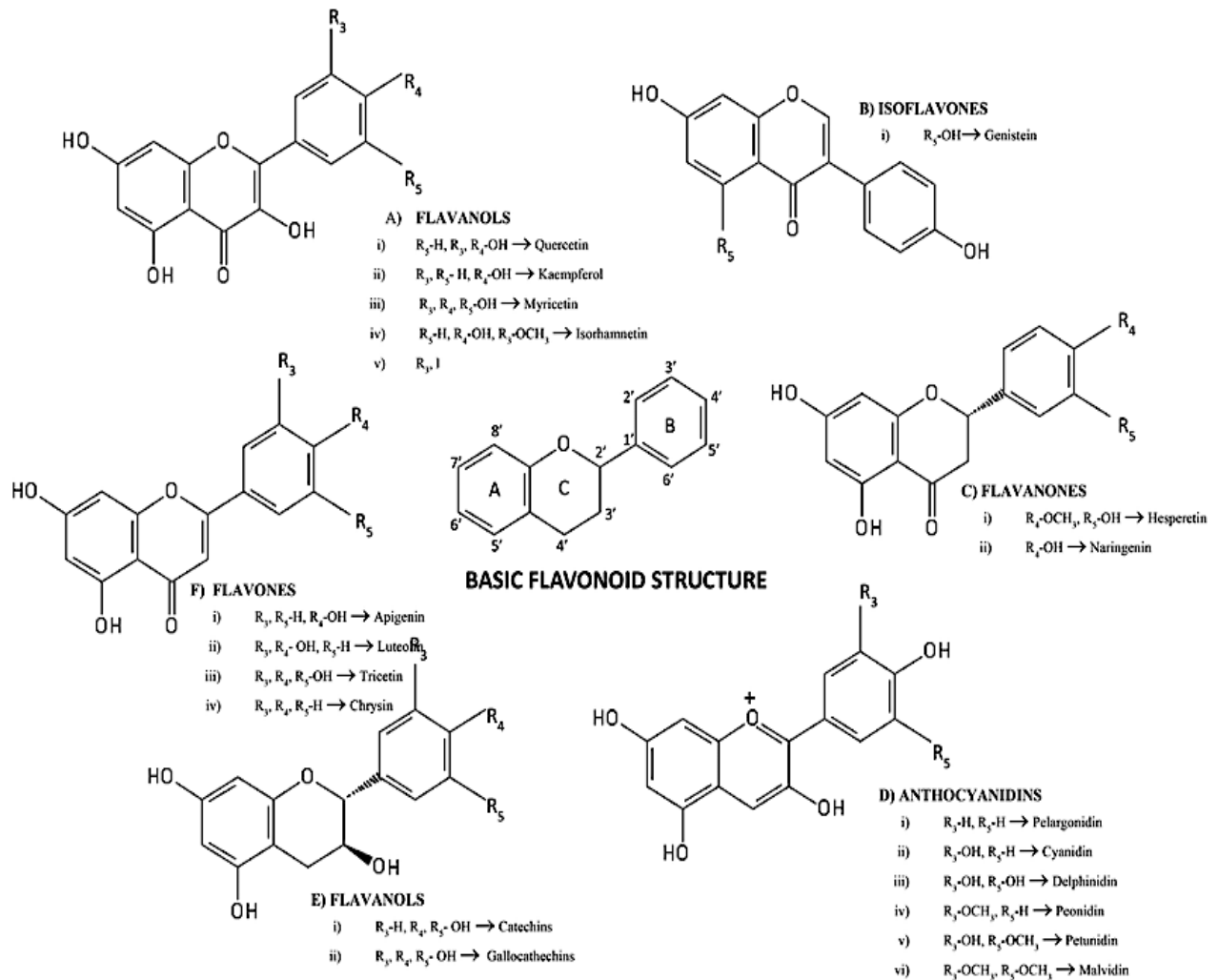


Figure 2. Structure chimique de principales classes des flavonoïdes (Santhakumar et al., 2018).

➤ **Les tanins :** Les tanins sont des polyphénols hydrosolubles, de structure hautement polymérisée, à poids moléculaire compris entre 500 et 3000 Da, connus par leur aptitude à fixer et précipiter les protéines en particulier la gélatine ainsi que d'autres composés organiques y compris les alcaloïdes, et sont responsables de l'amertume et de l'astringence de nombreux fruits et légumes (pomme, raisin...) et de leurs produits dérivés (Delcambre, 2010). Ces molécules organiques sont produites par de nombreuses espèces botaniques dont ils confèrent un moyen de défense contre l'agression des herbivores et phytopathogènes. On distingue deux groupes de tanins qui se différencient par leurs structures et également leurs origines biogénétiques : les tanins hydrolysables et les tanins condensés (Zakkad, 2017) :

- *Les tanins hydrolysables*, sont divisés en 2 sous-classes : les gallotannins et les ellagitannins. Ces molécules chimiques sont formées d'un hydrate de carbone, généralement le D-glucose, dont lequel les fonctions hydroxyles libres sont estérifiées

par un acide phénolique, l'acide galinique (gallotannins) ou l'acide ellagique (ellagitannins) (fig.3). Ils sont caractérisés par le fait qu'ils peuvent être dégradés par hydrolyse chimique (alcaline ou acide) ou enzymatique (**Legrand, 2015**).

- *Les tanins condensés*, appelés aussi proanthocyanidines, sont des polymères des flavonoïdes formés spécifiquement par des sous-unités de flavan-3-ol ou flavan-3,4-ol (fig.4). Ils ne renferment pas de sucre dans leurs structures et résistent à l'hydrolyse contrairement aux tannins hydrolysables (**Zakkad, 2017**).

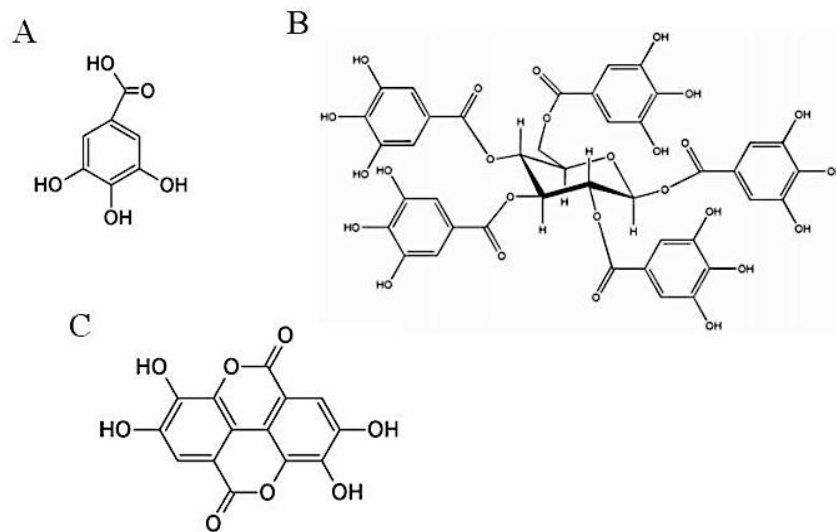


Figure 3. Structure chimique de l'acide galique (A), d'un tannin hydroxysable, et le pentagalloylglucose (polymère formé de glucose et de 5 unités de glucose) (B), et l'acide ellagique (C) (**Legrand, 2015**).

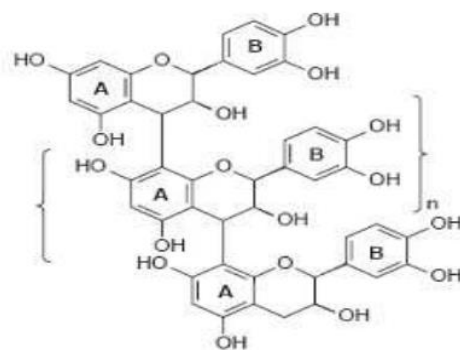


Figure 4. Structure de base des tannins condensés (**Zakkad, 2017**).

4 Méthodes d'extraction et purification

4.1 L'hydrodistillation

L'hydrodistillation est l'une des plus anciennes techniques d'extraction des composés volatils odoriférants des plantes, qui aurait été utilisée dès l'antiquité par les perses pour fabriquer l'eau de rose. Aujourd'hui elle est mise en œuvre dans différents secteurs, de la pharmacologie, la cosmétologie ou le domaine agro-alimentaire (**Muther, 2015**). Cette technique s'accomplit dans un alambic, elle consiste à récupérer les HEs des matières végétales par la vapeur d'eau. Sous l'action de la chaleur, les cellules végétales libèrent les molécules odorantes qui sont entraînées par la vapeur d'eau formée. Elles passent dans un réfrigérant pour y être condensées par refroidissement. La séparation de l'eau et de l'huile essentielle se fait par différence de densité dans un décanteur ou essencier (**El Haib, 2011**).

4.2 L'extraction par solvants organiques

L'extraction par des solvants organiques consiste à dissoudre la matière odorante de la plante dans un solvant que l'en fait ensuite évaporer. Elle peut se faire par mise en contact direct du matériel végétal avec un solvant adéquat dans un réacteur adapté (extraction solide/liquide), ou en faisant un transfert ou échange de matière entre deux phases liquides, la solution et le solvant (extraction liquide/liquide) (**Bousbia, 2011**). Cette méthode est utilisée pour les organes végétaux fragiles ou contenant une concentration en essence relativement faible ou pour les essences que l'on ne peut extraire par distillation.

L'extracteur de Soxhlet est l'appareil le plus utilisé en laboratoire pour réaliser une extraction par solvants organiques. Dans cette appareillage un système de régénération interne du solvant permet de mettre en contact en permanence la matière végétale avec du solvant pur, cela permet l'épuisement de la matière végétale en faisant des lavages successifs par le même solvant (**Herzi, 2013**).

4.3 L'extraction par le CO₂ supercritique

L'état supercritique est un des états de la matière, intermédiaire entre l'état liquide et gazeux. Il est obtenu lorsque le fluide est chauffé au-delà de sa température critique et comprimé au-dessus de sa pression critique (31,1°C et 75 bars dans le cas du CO₂). A cet état le fluide possède de remarquables propriétés de solubilisation des substances organiques. (**Herzi, 2013**). L'extraction par fluides supercritiques notamment le CO₂ supercritique prend de plus en plus d'importance par rapport aux techniques conventionnelles utilisant les

solvants organiques, du fait qu'il est non inflammable, non toxique, chimiquement inerte, très abondant, peu couteux et ne pose pas de problème de sécurité (Herzi, 2013).

5 Caractérisation physicochimique

Après extraction, c'est important de penser à vérifier la qualité des produits d'extraction et leurs teneurs en métabolites secondaires avant d'enchaîner une analyse chromatographique ou spectrométrique ou une synthèse organique par exemple. La détection des différentes familles chimiques (alcaloïdes, flavonoïdes, tannins...etc.), peut se faire par chromatographie sur couche mince ou par des tests de précipitation des composés sous l'action de réactifs chimiques spécifiques. Il s'agit de tests qualitatifs permettant de mettre en évidence des squelettes de base caractéristiques de certaines familles de composés. Selon le test et le type de composé à mettre en évidence, différentes colorations témoignant sa présence ou son absence, sont observées avec des intensités variables suivant sa teneur dans l'échantillon analysé (Mamadou, 2018).

6 Analyses chimiques et dosage

6.1 Analyses chromatographiques

La chromatographie est une technique de séparation des constituants d'un mélange par entraînement au moyen d'une phase mobile (liquide, gazeuse ou un fluide supercritique) le long d'une phase stationnaire. Les composés du mélange parcourent la phase stationnaire avec des temps proportionnels à leurs propriétés intrinsèques (taille, structure, ...) ou à leur affinité avec la phase stationnaire (polarité, ...)

6.1.1 Chromatographie sur couche mince CCM

La CCM repose principalement sur des phénomènes d'adsorption : la phase mobile appelée également éluant est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de plastique ou d'aluminium à l'aide d'un liant. La silice est la surface la plus utilisée mais on retrouve également des plaques d'alumine ou de cellulose. Le gel de silice fait partie des phases stationnaires de polarité élevée. Après que l'échantillon ait été déposé sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature (polarité) et de celle du solvant. Le choix de solvant est le point crucial pour réussir une bonne séparation en

CCM. Il dépend de la polarité des constituants qu'on a à séparer. De nombreux éluants peuvent être utilisés :

- ✓ Solvants apolaires : hexane, éther de pétrole...
- ✓ Solvants polaires : éther, éthanol, dichlorométhane...

La silice contient une petite quantité d'un indicateur fluorescent dans l'UV, utile pour l'étape de révélation des composés analysés (**Mamadou, 2018**).

6.1.2 Chromatographie en phase gazeuse et chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse (GC/MS)

La chromatographie en phase gazeuse (CPG), est une technique de séparation qui permet de qualifier et quantifier les composantes d'un échantillon voir même les identifier lorsqu'elle est couplée à la spectroscopie de la masse (GC/MS). Cette technique de séparation convient exclusivement pour des échantillons gazeux et les molécules qui sont stables à des températures suffisamment élevées pour assurer la vaporisation de tous les composés du mélange à analyser. Comme toutes les techniques chromatographiques, la CPG repose sur l'interaction des molécules à séparer (les analytes) avec deux phases : la phase mobile qui est ici un gaz inerte appelé « gaz vecteur » le plus souvent : l'He, N₂, H₂... etc., et la phase stationnaire qui peut être un solide adsorbant, on parle alors de CPG d'adsorption, ou un liquide c'est alors la CPG de partage (**Drouet, 2015**). L'appareil utilisé pour procéder une CPG est un « chromatographe » comme le désigne la fig.5.

Le système d'injection ou l'injecteur permet d'introduire le mélange à séparer à l'aide d'une microseringue. Il est chauffé à une certaine température assurant la vaporisation de tous les analytes avant d'être entraînés par le gaz vecteur à travers la colonne. Le gaz est introduit dans l'injecteur depuis une bouteille de gaz comprimé, accompagnée d'un débitmètre (**Drouet, 2015**). Le choix de gaz vecteur et en fonction du détecteur utilisé : Détecteur à ionisation de flamme (FID), Détecteur à conductibilité thermique (TCD) ou autres.

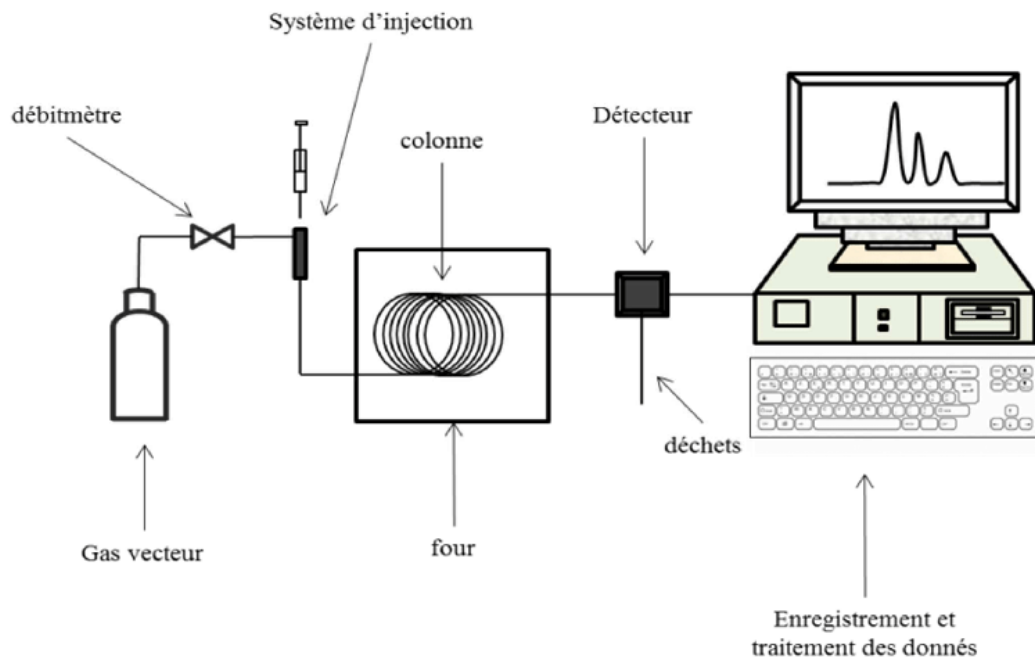


Figure 5. Schéma représentatif de l'installation du système de chromatographie CPG (Bui Van Hoi, 2013).

6.1.3 Chromatographie liquide haute performance HPLC et LCMS

La chromatographie en phase liquide à haute performance, souvent désignée par son abréviation en anglais HPLC (High performance liquid chromatography), est l'une des innovations les plus notables dans le domaine de la recherche analytique, elle permet de séparer, identifier, et quantifier les composants de mélanges même très complexes avec une bonne précision (Blum, 2014).

Un système HPLC typique comprend les éléments montrés dans la figure ci-dessous. Un récipient sert d'un réservoir de la phase mobile, qui est généralement un mélange de deux solvants de polarités différentes, utilisés dans un gradient de sorte que la polarité globale peut être diminuée ou augmenté comme souhaité (Blum, 2014). Une pompe à haute pression est utilisée pour générer et mesurer un débit spécifié de phase mobile. L'échantillon est introduit dans l'injecteur, et est entraîné par le flux de la phase mobile à travers la colonne. Les colonnes utilisées en HPLC sont de quelques centimètres de longueur renfermant ainsi la phase stationnaire qui est formé de particules de silice de faible granulométrie. Ces deux critères ont d'avantage d'augmenter la rapidité de l'analyse (Kalili, 2011). En traversant la colonne les molécules à séparer interagissent avec la phase stationnaire à divers degrés en fonction de leur polarité ; les molécules ayant une polarité proche de celle de la phase stationnaire, s'adsorbent à cette dernière et prennent plus de temps pour être retiré de la colonne alors que les molécules de polarité différente ont moins d'affinité pour celle-ci et

donc sont éluées avec un temps de rétention court. A la sortie de la colonne les molécules séparées sont révélées par un détecteur à UV, et les résultats sont enregistrés et interprétés dans un système informatique (**Blum, 2014**).

La HPLC peut être couplée à une spectroscopie de masse (MS) pour donner lieu à une méthode analytique plus performante connue sous le nom de chromatographie liquide-spectroscopie de masse (LC-MS), qui peut être utilisée pour déterminer la masse moléculaire des composés analysés.

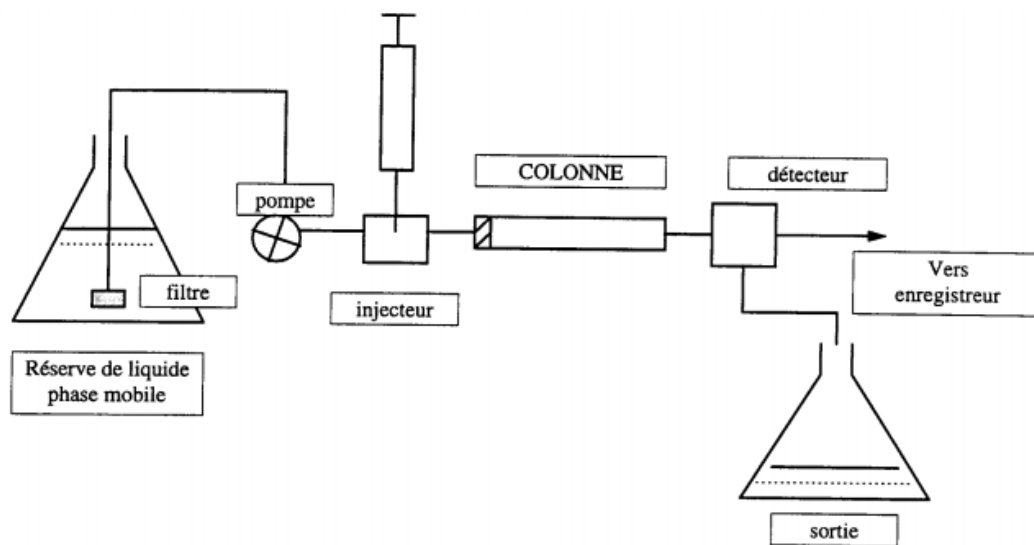


Figure 6. Schéma du principe de la chromatographie HPLC (**Boudehenn et al., 2011**)

6.2 Méthodes spectrales

6.2.1 Spectrométrie de masse MS

La spectroscopie de masse (MS) est une technique d'analyse physique puissante permettant la détermination de la masse des molécules, leur identification et leur quantification (**Marinach-Patrice et al., 2011**). Elle se base sur des phénomènes d'ionisation par addition d'un ion (H^+ par exemple) ou soustraction d'un électron à la molécule. Les ions formés appelés ainsi « ions moléculaires » sont accélérés et séparés à l'aide d'un champ magnétique et/ou électronique, et classés en fonction des rapports de leurs masses sur leurs charges. La lecture du spectre de masse des ions détectés permet la détermination de la structure chimique des molécules analysées. (**Menet, 2011**).

6.2.2 Résonance magnétique nucléaire RMN

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est une autre méthode d'analyse spectrale qui présente l'avantage de donner des informations localisées au niveau de chaque atome de la molécule analysé reflétant sa structure 3D (**Mispelster, 2007**). Elle est fondée sur la capacité que possèdent les noyaux atomiques d'absorber l'énergie lorsqu'ils sont soumis à un rayonnement électromagnétique, puis la relâcher et revenir à l'état initial. Le phénomène de résonance utilise une propriété quantique, le moment cinétique de spin nucléaire, c'est-à-dire leur mouvement intrinsèque ou sa rotation sur lui-même, qui dépend elle-même de la composition du noyau atomique (protons et neutrons) (**Lévy-Leblond, 2017**).

7 Activités biologiques des composés bioactifs

7.1 Activité antioxydante

L'organisme humain produit en permanence des espèces réactifs d'oxygène (ROS) qui peuvent être des radicaux libres (O_2^- : anion superoxyde, OH : radical hydroxyle) ou des molécules non radicalaires (O_2 singulet) qui proviennent pour la plus part de la chaîne respiratoire, et il est équipé d'un système complexe de défenses enzymatiques et non enzymatiques pour contrôler leur expression (**Berger Mette, 2006**). Cependant, un excès non neutralisé des ROS provoque des effets délétères dus soit à une défense antioxydante défailante, soit à un état pro-oxydatif accru, nommé stress antioxydant (**Berger Mette, 2006**). De nombreuses publications scientifiques ont montrés que de nombreuses pathologies humaines sont causées ou favorisées par le stress oxydant (**Hadri Ghembaza, 2015**). Parmi les classes des antioxydants naturels, les métabolites secondaires des végétaux notamment les polyphénols comme les flavonoïdes et les tannins, ainsi les vitamines telles que la vitamine A, E et la vitamine C, sont très connues pour leurs propriétés antioxydantes. Ils peuvent agir comme des piègeurs des radicaux libres, désactivateur des oxygènes singlets, chélateurs de métaux pro-oxydatifs, et stimulateurs des défenses antioxydants enzymatique de l'organisme (**Benhammou et al., 2009 ; Hadri Ghembaza, 2015**).

7.2 Activité antibiotique

Des travaux de recherche ont démontrés l'efficacité des extraits des plantes médicinales telles que la cannelle, le laurier (Lauraceae) (**Merghni et al., 2016 ; Senhaji et al., 2005**), l'Arbre à thé, l'eucalyptus (Myrtaceae) (**Laurain-Mattar et al., 2019**), et le rosmarin (Lamiaceae) (**Ebenezer et al., 2002**) et bien beaucoup d'autres contre les microorganismes

pathogènes, non seulement les bactéries mais aussi les champignons, les levures, les virus et les parasites. Récemment des études ont été menées dans le but d'isoler et d'identifier les métabolites secondaires responsables de l'activité antimicrobienne des plantes médicinales. Certains flavonoïdes comme la quercétine, la myricétine, et des composés phénoliques notamment la curcumine et l'acide gallique, ainsi que des alcaloïdes tels que la pépirine ont montrés un fort potentiel antibactérien contre des bactéries impliquées dans les pneumonies notamment *Mycobacterium tuberculosis* et *Streptococcus pneumoniae* (**Adnan et al., 2019**).

Parmi ces composés, les polyphénols, les flavonoides et les terpènes, présentent également des propriétés antivirales notamment contre le virus de l'Herpès simplex 1 HSV-1, le HIV, le virus de la grippe H1-N1, le virus de la dengue et le polio-virus, (**Ebenezer et al., 2002**). Par ailleurs, de nombreux groupes de chercheurs s'intéressent à l'étude du potentiel anti-biofilm et anti-quorum sensing des extraits des plantes médicinales et leurs principes actifs (**Bodede et al., 2018 ; Omwenga et al., 2017 ; Merghni et al., 2016**).

8 Intérêt industriel

Les substances naturelles issues des végétaux ont des multiples utilisations possibles dans l'industrie pharmaceutique, agroalimentaire et cosmétologique. Aujourd'hui, 50 % des petites molécules mis sur le marché pour le traitement des cancers, et les médicaments les plus efficaces pour soigner la grippe ou le paludisme, sont des extraits ou des dérivés végétaux. Parmi ces médicaments, on trouve le Taxol isolé de l'if qui a fait ses preuves dans le traitement du cancer du sein ; L'artémisinine, isolée d'une armoise chinoise, dans le traitement du paludisme ; l'acide shikimique, isolé des graines d'anis qui a donné naissance à l'oseltamivir, un des rares médicaments dont l'efficacité est prouvée dans le traitement de la grippe (Tamiflu®) (**Faye et al., 2008**). Les extraits de plantes ont été également impliqués de façon très importante dans l'industrie cosmétologique notamment le domaine de la parfumerie (ex. l'HE de rose, jasmine, patchouli...etc.), et dans la production des produits d'hygiène corporelle et entretien de la peau (crèmes cicatrisantes, anti-âge, shampooings, savons, lotions... etc.) (**Fabre, 2017**).

Chapitre II. L'hémi-synthèse de Molécules Biologiquement Actives

1 Introduction

La chimie organique a vu reconnaître au cours des dernières décennies des innovations impressionnantes dans les techniques de synthèse et de purification des composés bioactifs mimiques des composés naturels, qui ont permis l'identification et l'isolement de nombreuses molécules à visée thérapeutique issues des plantes médicinales mais aussi des animaux et des microorganismes. Cependant, la fabrication industrielle des médicaments à base de substances naturelles, s'est heurtée rapidement à de nombreuses difficultés liées au problème d'approvisionnement de la matière première, et le faible rendement des procédés d'extraction, ce qui nécessite une quantité énorme de matière première pour une production à l'échelle industrielle. Actuellement, la chimie extractive est de plus en plus remplacée par la synthèse organique et l'hémi-synthèse qui présente de multiples avantages économiques et écologiques très appréciables.

2 Principe de l'hémi-synthèse

L'hémi-synthèse est un type de réaction de synthèse organique qui a pour point de départ une substance naturelle (la molécule d'intérêt) qui présente des fonctions chimiques libres réactionnelles. Le principe est donc de modifier chimiquement la structure de la molécule de départ (précurseur) pour produire une molécule biologiquement active qui peut être considérée comme une nouvelle molécule active (**Da Sliva et al, 2012 ; Léversque et al., 2000**). Elle permet d'avantage de réduire considérablement les étapes et le coût de la synthèse totale et d'avoir la possibilité de jouer sur les propriétés pharmacologiques de la molécule cible afin de la rendre plus performante, plus assimilable par l'organisme et/ou beaucoup moins toxique (**Ribeiro et al., 2019**).

3 La place de l'hémi-synthèse en pharmacie

L'hémi-synthèse a été introduite dans l'industrie pharmaceutique depuis des années, et elle a abouti à des découvertes étonnantes qui ont marqué l'histoire des médicaments. On pourra citer quelques exemples en ce qui suit :

- **La découverte du Taxostère :** Le Taxotère® est un analogue semi-synthétique du Taxol (fig.7 ; nom générique paclitaxel), un composé diterpénique extrait d'écorce d'ifs du Pacifique (*Taxus brevifolia*) isolé pour la première fois par Wani et Wall en 1971 (Da Silva et al., 2012). Le Taxol est un médicament anticancéreux efficace largement utilisé dans le traitement de divers types de cancers, (Jennewein et al., 2001). Cependant, malgré son grand intérêt thérapeutique, l'approvisionnement en *T.brevifolia*, ainsi que son faible rendement en Taxol a représenté un obstacle qui a limité son développement clinique. A titre d'exemple, l'extraction de 1 kg de Taxol exigeait environ 6,7 tonnes d'écorce de *T.brevifolia*, un équivalent de 2 000 –3 000 arbres (Jennewein et al., 2001), ce qui pose un problème écologique crucial qui peut conduire à l'extinction de l'espèce. Cela amena les scientifiques de rechercher d'autres méthodes de synthèse du taxol et des origines renouvelables.

Des équipes de recherche ont eu l'idée de travailler sur les aiguilles et les feuilles de *Taxus baccata*, ils y découvrent alors une substance intéressante la 10-déacétyl-baccatine III (DAB) qui peut représenter une matière première pour l'hémi-synthèse du Taxol. La réaction consiste à greffer la chaîne latérale N-benzoyl-3-phénylisosérine au groupe hydroxyle C-13 de DAB et acétylation de la position 10 β -hydroxyle et la synthèse du Taxotère (N-débenzoyl-Ntert-butoxycarbonyl-10-déacétyl taxol, ou docétaxel) par addition de la chaîne latérale N-t-butoxylcarbonyl-3-phénylisoserine à la position 13 α du DAB. Ce composé intermédiaire de la synthèse du taxol s'est avéré 2 fois plus actif que ce dernier (Da Silva P et al., 2012 ; Jennewein et al., 2001).

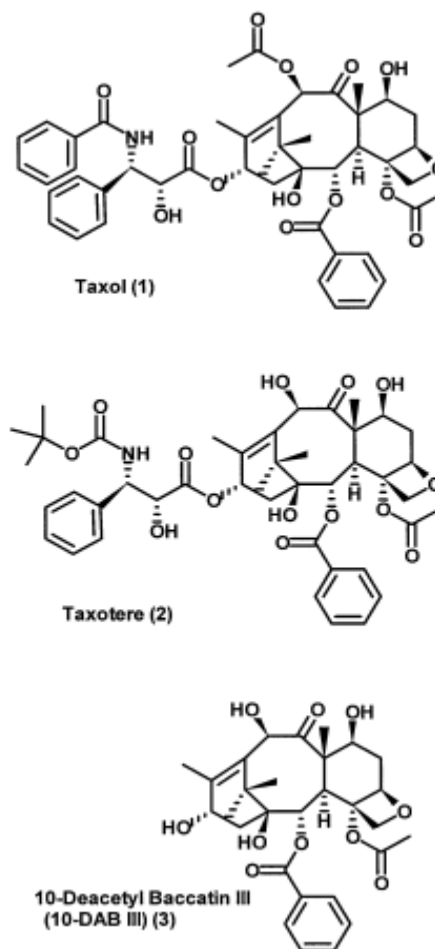


Figure 7. Structure chimique du Taxol (1), Taxotère (2) et la 10-déacétyl-baccatineIII(DAB) (3) (Jennewein et al., 2001).

- **La synthèse de l'acide acétyl-salicylique :** L'acide acétyl-salicylique ou l'aspirine fait partie des médicaments les plus fréquemment prescrits par les médecins et utilisés en automédication. Cette molécule possède à la fois des propriétés analgésiques (contre la douleur), antipyrétique (baisse la fièvre), anti-inflammatoire et anti-agrégante plaquettaire (antithrombotique) (Lévesque et al., 2000). L'acide acétyl-salicylique dérive de la salicine le principe actif de saule, cette plante à vertus miraculeux a été utilisée depuis l'antiquité sous forme de décoctions ou tisanes pour soulager les douleurs de l'enfantement, les états inflammatoires et certaines atteintes oculaires (Lévesque et al., 2000).
- **L'hémi-synthèse des antibiotiques (ATBs) :** L'hémi-synthèse fut introduite dans l'ère des ATBs avec la synthèse de la dihydrostreptomycine en 1946 par hydrogénation catalytique de la streptomycine isolée du microbe tellurique *Streptomyces griseus* (fig.8), et qui a été caractérisée par une plus grande stabilité chimique avec une activité antimicrobienne similaire (Ribeiro et al., 2019). Ces deux ATBs ont rapidement trouvés des applications cliniques (Wright et al., 2014).

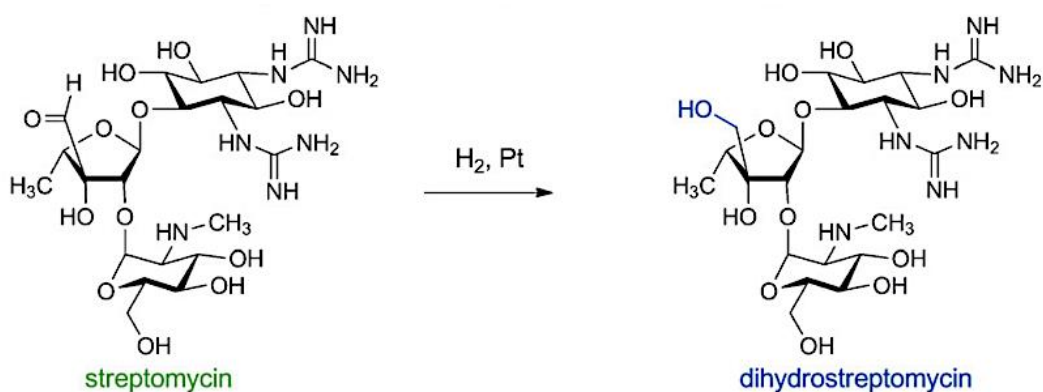


Figure 8. Hémi-synthèse de la dihydrostreptomycine (Wright et al., 2014).

4 Réactivités des aldéhydes avec les composés hétérocycliques

Les extraits des plantes aromatiques jouent encore un rôle majeur en chimie de synthèse organique. En particulier, les aldéhydes aromatiques sont couramment utilisés en hémi-synthèse pour le développement d'un large éventail de molécules thérapeutiques intéressantes telles que : les imines, les benzimidazoles, les benzodiazépines et bien d'autres (Chebrouk et al., 2019).

4.1 Réaction avec l'Ortho-phylenediamine

Sous des conditions oxydantes, les aldéhydes aromatiques réagissent bien avec les orthénylènediamines pour donner lieu au benzimidazoles correspondants (**Soklou, 2016**). Ils constituent une classe de composés hétérocycliques d'un grand intérêt dans le domaine pharmaceutique et la conception des médicaments (les benzimidazoles feront l'objet du chapitre suivant).

4.2 Réaction avec le methanediamine

Le menthanediamine (ou 1,8 – diamino-*p*-menthane) peut interagir avec les aldéhydes dans des conditions expérimentales douces pour produire diverses bases de Schiff dérivés du *p*-menthane d'intérêt environnemental et biologique. **Zhao et al. (2020)** ont rapporté la synthèse d'une série de dérivés 1,8-bis(Schiffbase)-*p*-menthane présentant une activité herbicide ou régulatrice de la croissance végétal. Les bases de Schiff dérivées de *p*-menthane ont été préparées par réaction de 1,8 - diamino-*p*-menthane avec des dérivés de benzaldéhyde dans un solvant organique polaire (méthanol, éthanol, tétrahydrofurane, diméthylformamide ou dimethylsulfoxyde).

Chapitre III. Les Dérivés Benzimidazoles

1 Introduction

Les benzimidazoles, constituent un groupe de composés hétérocycliques extrêmement polyvalent en points de vue activités biologiques, qui ont trouvé des applications pratiques dans un certain nombre de domaines tels que la synthèse des molécules biologiquement actives. Ces molécules formées de deux cycles accolés : un cycle benzénique et un imidazole ont été couramment utilisés comme précurseurs de synthèse dits « privilégiés » pour le développement de molécules d'intérêt thérapeutique et pharmaceutique. Plusieurs dérivés du benzimidazoles sont déjà des médicaments largement utilisés à savoir le thiabendazole : un antihelminthique utilisé pour traiter diverses parasitoses ; l'omeprazole, un médicament de la classe des inhibiteurs de pompe à protons (PPI) (fig. 9), qui est utilisé pour le traitement de divers pathologies gastro-intestinales, antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II dans le traitement de l'hypertension artérielle, des antihistaminiques H1...etc. (Soklou, 2016). La synthèse de dérivés du benzimidazoles reste une préoccupation majeure en chimie médicinale, et le développement de médicament. Les chercheurs dans ce domaine tentent activement à trouver de nouvelles utilisations pour cet hétérocycle (Alasmary et al., 2015).

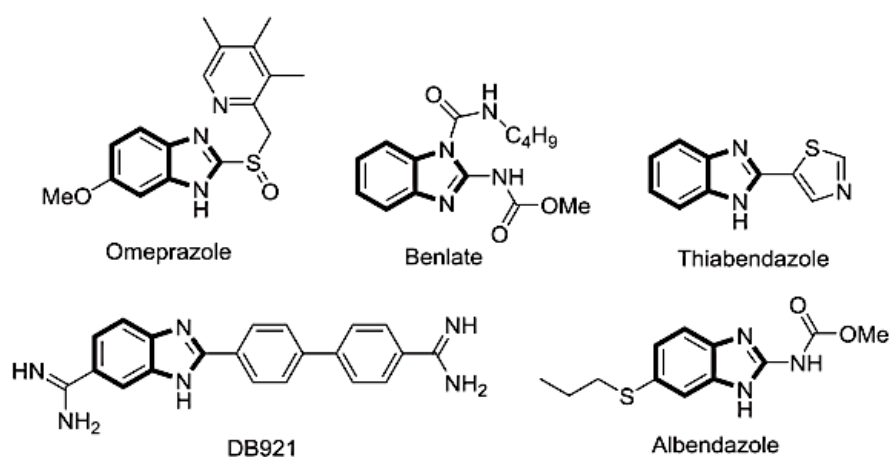


Figure 9. Exemple de molécules biologiquement actives contenant le motif benzimidazole (Zhu et al., 2017).

2 Propriétés structurales

Les benzimidazoles sont des molécules formées d'un cycle benzénique fusionné à un cycle imidazole. Le noyau imidazole est un hétérocycle à 5 chaînons, possédant un groupe imino (NH) situé en position 1, et un atome d'azote tertiaire en position 3. Ainsi, le benzimidazole résulte de l'accolement du cycle benzénique aux positions 4,5 du cycle imidazole (fig.10). Il est ainsi possible de concevoir une large gamme de dérivés du benzimidazole en remplaçant l'hydrogène à différentes positions de l'anneau benzimidazole avec différents groupes fonctionnels, garantant de la variabilité de leurs effets pharmacologiques (Saber et al., 2019).

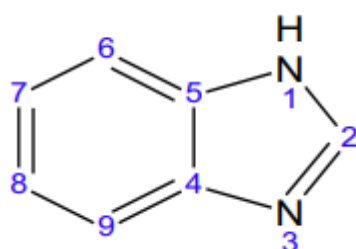


Figure 10. Structure chimique du noyau benzimidazole.

3 Réactions et mécanismes de synthèse

La synthèse chimique du benzimidazole a été réalisée pour la première fois par Hoebrecher en 1872, qui arrivait à produire le composé 2,5 (ou 2,6) diméthylbenzimidazole par réduction de 2-nitro-4-méthylacetanilidine (fig.11) (Wright, 1951 ; Yadav et al., 2014 ; Soklou, 2016).

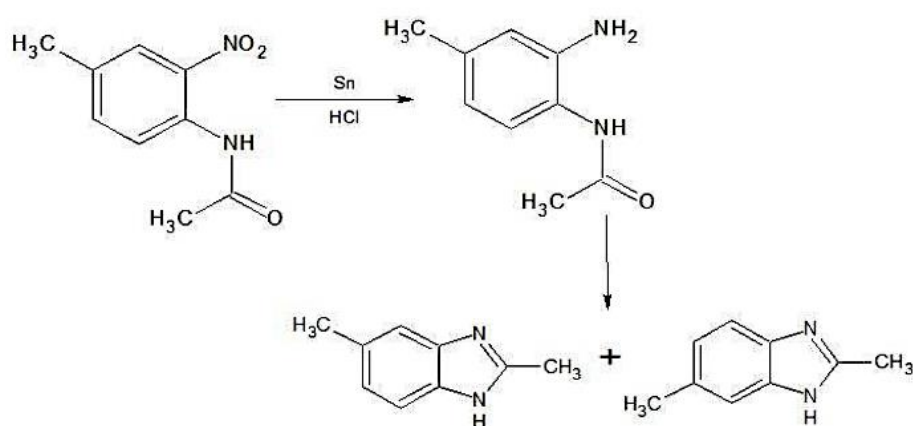


Figure 11. Synthèse de 2,5 (2,6) diméthylbenzimidazole (Soklou, 2016).

Plusieurs méthodes et stratégies de synthèse ont été développées, commençant presque toujours par un dérivé du benzène possédant deux fonctions amine dans une position ortho. La plupart de ces méthodes impliquent la condensation l'orthophénylendiamine (OPA) avec les acides carboxyliques, les aldéhydes aromatiques, les nitriles, les esters...etc. (**Soklou, 2016**). Ainsi, un nombre illimité de catalyseurs et réactifs chimiques est utilisé dans des conditions réactionnelles très variées. La condensation de l'OPA avec divers acides carboxyliques est la méthode la plus utilisée et la plus rentable pour la préparation des dérivés de benzimidazoles. La réaction est généralement réalisée à chaud en présence d'un acide fort. Cette voie de synthèse est la méthode par excellence de préparation du benzimidazole et ses dérivés 2-substitués qui donne généralement de très bons rendements (**Molou et al., 2010**).

Zhu et al. (2017) ont mis au point une méthode simple pour la préparation des dérivés du benzimidazoles à partir de l'OPA et des dérivés de DMF (N,N-diméthylformamide) en présence de PhSiH_3 (fig. 12).

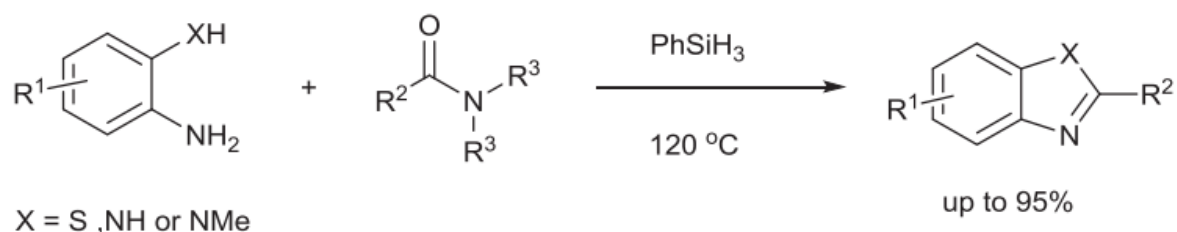


Figure 12. Synthèse de benzimidazoles à partir de l'OPA et de dérivés du DMF en présence de PhSiH_3 (**Zhu et al., 2017**).

Taha et al., (2015) ont synthétisé une série de benzimidazoles en constituant un mélange équimolaire de 3,5-dichloro-1,2-diamine des aryl-aldéhydes dans le DMF et le métabisulfite de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) (fig. 13).

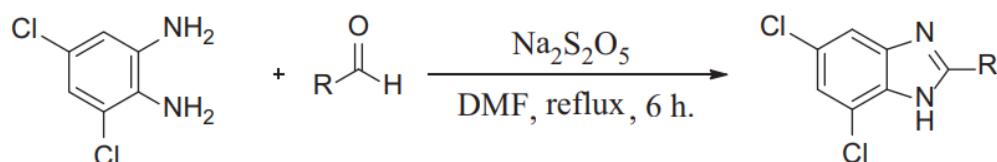


Figure 13. Synthèse de benzimidazoles à partir de 3,5-dichloro-1,2-diamine et des aryl-aldéhydes (**Taha et al., 2015**).

Des dérivés 2-aminobenzimidazoles cyano, méthyl et nitro-substitués ont été préparé par **Hranjec et al. (2011)** à partir de l'OPA correspondant et du bromure de cyanogène (fig. 14).

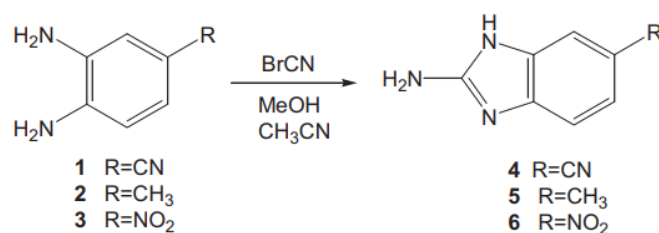
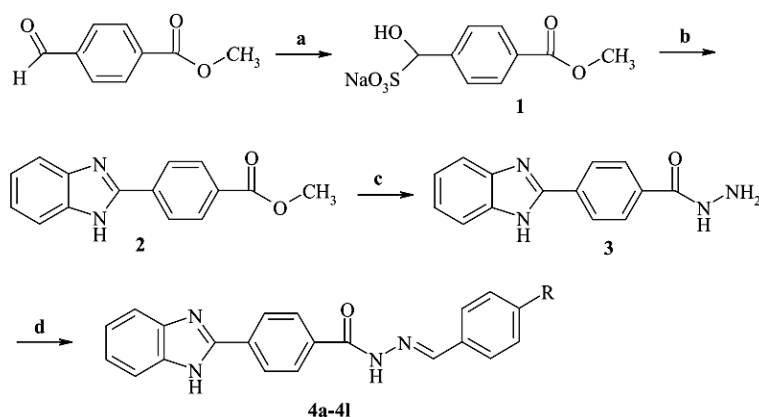


Figure 14. Synthèse des dérivés 2-aminobenzimidazoles cyano, méthyl et nitro-substitués (**Hranjec et al., 2011**).

Ozkay et al., (2010) ont synthétisé certains nouveaux dérivés benzimidazole-hydrazones, suivant la procédure indiquée dans la figure 15. La réaction s'est déroulée en quatre étapes. Tout d'abord, le bisulfite de sodium a été dissout dans une solution éthanolique diluée avec de l'ester méthylique de l'acide 4-formylbenzoïque pour préparer le composé **1**. En deuxième lieu, l'OPA est mis en réaction avec le composé **1** et le DMF pour obtenir l'ester méthylique de l'acide 4-(1H-benzimidazole-2-yl)benzoïque (**2**) qui a ensuite été traité avec un excès d'hydrazine hydrate pour obtenir de l'acide 4-(1H-benzimidazole-2-yl)benzoïque hydrazide (**3**). En dernière étape, la réaction du composé **3** avec des dérivés 4-substitués de benzaldéhydes dans le butanol en présence de l'acide acétique glacial a abouti aux produits (**4a-4l**).



R: -H, -OH, -N(CH₃)₂, -Cl, -Br, -F, -CH₃, -OCH₃, -NO₂, -CF₃, COOH, CN

Figure 15. Synthèse des dérivés benzimidazol- hydrazones (**Özkay et al., 2010**).

EL-Sayed et al. (2016) ont préparé une série de dérivés benzimidazole-2-ones ou benzimidazole-2-thiones à des rendements très élevés (64%-97%) par une méthode de synthèse relativement récente : le broyage à bille en absence du solvant, par réaction de l'OPA avec différents acides carboxyliques, aldéhydes, urée, thiourée ou thiocyanate d'ammonium (fig.16). En variant les principaux paramètres de la réaction qui comprennent : la fréquence de rotation, le poids des billes de broyage et le temps de broyage ils arrivaient à la meilleure combinaison qui donne le maximum de rendement en utilisant des billes de 56.6 g pendant 60 min de rotation à 20 Hz. D'autre part, l'alkylation du benzimidazolones et benzimidazolthiones suivant la même procédure en présence du chloroacétate d'éthyle a permis d'obtenir les produits correspondants à des rendements de 97% et 83% respectivement, en pratiquement 20min de réaction (fig.17)

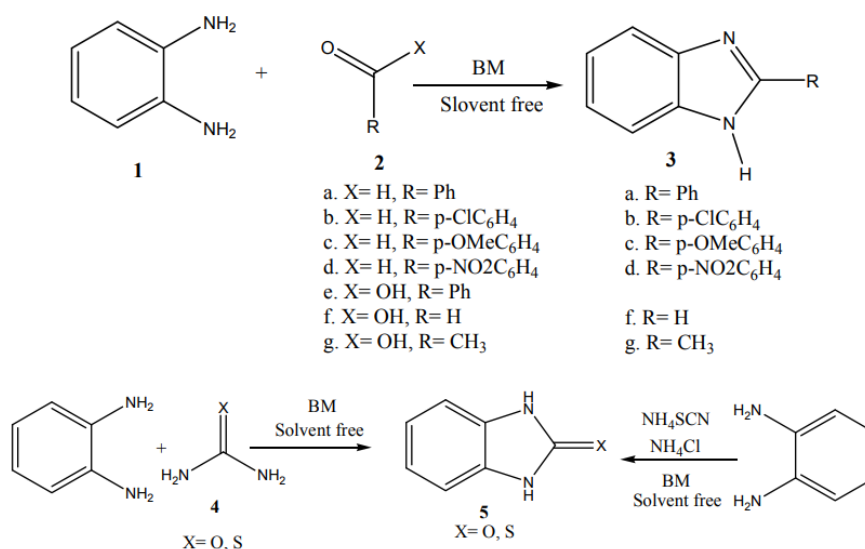


Figure 16. Synthèse des dérivés benzimidazole-2-one et benzimidazole-2- thiones (EL-Sayed et al., 2016).

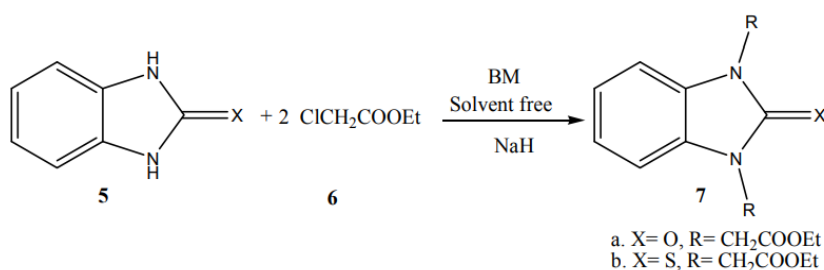


Figure 17. Alkylation de benzimidazole-2-one et benzimidazole-2-thiones (EL-Sayed et al., 2016).

Estrada-Soto et al. (2006) ont rapporté la synthèse de deux dérivés 5-nitrosubstitués de benzimidazoles, le 2-(5-Nitro-1H-benzimidazol-2-yl)phenol et 2-(4-Methoxyphenyl)-5-nitro-1H-benzimidazole, par condensation du 4-nitro-1,2-phenylenediamine avec le salicylaldéhyde et p-anisaldéhyde respectivement, sous irradiation par micro-ondes en présence du Na₂S₂O₅ (fig. 18). Cette voie de synthèse par micro-ondes a permis d'obtenir des rendements très importants (93% et 80%) en un temps de réaction très court (40-50s).

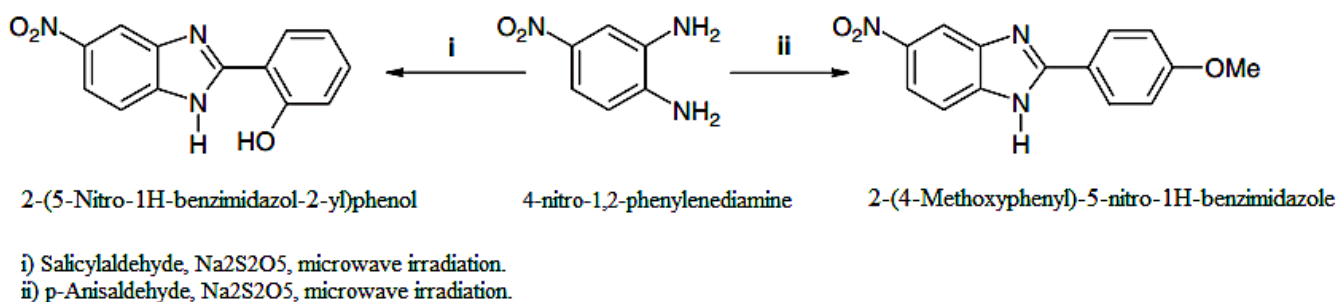


Figure 18. Synthèse des dérivés 5-nitro-substitués de benzimidazoles (**Estrada-Soto et al., 2006**).

4 Intérêt thérapeutique

Les propriétés pharmacologiques des dérivés benzimidazoles ont été largement étudiées. Toutefois, un intérêt particulier des chercheurs en chimie médicinale pour cette classe de composés hétérocycliques a été stimulé depuis l'identification d'un dérivé naturel du benzimidazole dans la composition de la vitamine B12 : le 5,6-diméthylbenzimidazole (**Yadav et al., 2014**). Le benzimidazole est aujourd'hui l'un des pharmacophores les plus importants dans le domaine pharmacomédical et la conception des médicaments en raison de la diversité des activités biologiques qu'il confère telles que l'activité antibactérienne, antivirale, antihelminthique, anti-inflammatoire, anticancéreuse... etc. (**Saber et al., 2019**).

5 Activité antibiotique

Compte tenu à l'incidence élevée des maladies infectieuses et le besoin urgent de nouveaux ATB pour surmonter l'émergence de la résistance microbienne, plusieurs classes de composés hétérocycliques ont été étudiées, en particulier les dérivés de benzimidazoles ont attiré le vif intérêt des scientifiques. La synthèse d'une série de fluoro-benzimidazoles a été effectuée par **Cevik et al. (2017)**. Ces dérivés ont été évalués pour leur activité contre diverses souches bactériennes impliquées dans les infections gastro-intestinales.

En particulier, le composé 4-[5(6)-fluoro-1H-benzimidazol-2-yl)-N'-(2-methylbenzylidene)]-benzohydrazide a montré un effet très intéressant contre les souches de références d'*E.coli* notamment le sérotype entéro-hémorragique (*Escherichia coli* O157:H7), et *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, avec des CMI allant de 0.49 à 0.98 µg/ml.

L'activité anti-bacille (antiTB) des benzimidazoles a été également signalée. **Gobis et al. (2015)** ont rapporté la synthèse d'une gamme de dérivés du benzimidazole substitués en position C-2 par quatre groupements fonctionnels différents (cyclohexylethyl, cyclohexylpropyl, phenylpropyl ou 4-phenylpyridine-2-yl). Les essais microbiologiques ont montrés que les dérivés substitués par le cyclohexylethyl et possédant un ou deux atomes d'halogène ou deux groupes méthéliques présentent un excellent potentiel antiTB notamment contre *Mycobacterium tuberculosis* et *Mycobacterium bovis* (CMI = 0.75-1.5 µg/ml). De même, nombreux médicaments à base de benzimidazoles de la classe des PPI (Rabeprazole, omeprazole...etc.) sont utilisés couramment pour le traitement des pathologies gastro-intestinales notamment les infections bactériennes à *Helicobacter pylori* (**Sharara, 2005**).

Plusieurs travaux de recherche ont indiqué l'excellent potentiel antiviral des médicaments à bases de benzimidazole contre diverses souches virales telles que le cytomégalovirus humain (HCMV), le virus de l'herpès simplex humain type-1 (HSV-1), le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et les virus de l'hépatite B et C (VHB et VHC) ...etc. (**Yadav et al., 2015**). Il existe divers médicaments à base de benzimidazole pour le traitement des infections virales. Maribavir (1263W94) et GW275175X (fig. 19) se sont deux exemples de médicaments à base de benzimidazole, utilisés souvent pour le traitement des infections virales à HCMV (**Kanwal, 2019**).

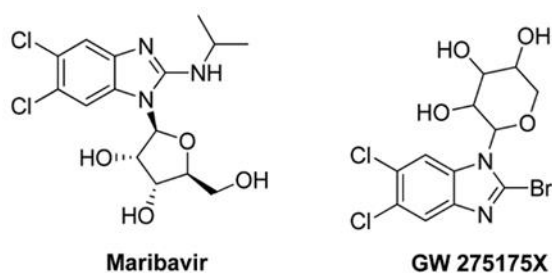


Figure 19. Médicament antiviraux à base de benzimidazoles (**Kanwal, 2019**).

6 Effet antibactérien au niveau moléculaire

Dans la recherche de nouveaux agents ATB, et de nouvelles stratégies thérapeutiques, de nombreuses cibles bactériennes peuvent être étudiées, et ceux qui ont récemment attiré plus d'attention sont : la division cellulaire, la voie de synthèse des acides gras, le quorum sensing, la formation des biofilms...etc.

La protéine FtsZ (*Filamentous temperature sensitive mutant Z*), une protéine clé de la division cellulaire bactérienne, est apparue comme une cible attrayante pour le développement de nouvelles molécules thérapeutiques antibactériennes (**Awasthi et al., 2011**). De nombreuses études ont signalé la capacité de certains dérivés de benzimidazoles à empêcher la division cellulaire chez les bactéries à Gram+ et à Gram- en bloquant l'activité de la protéine FtsZ (**Sangeeta et al., 2018 ; Knudson et al., 2015**). **Wang et al. (2019)** ont signalé la synthèse de dérivés amides pyrazol-benzimidazole présentant une activité antibactérienne par inhibition de la protéine FabH (β -Ketoacyl-Acyl Carrier Protein Synthase III), qui joue un rôle fondamental dans la voie de biosynthèse des acides gras FAS (type II), qui fournit des acides essentiels pour l'assemblage de composants cellulaires clés tels que l'enveloppe cellulaire, les phospholipides, les lipoprotéines, les lipopolysaccharides.

D'autre part, de nombreuses équipes de recherches tentent de la découverte de nouveaux médicaments à base du benzimidazole à pouvoir anti-pathogène ou anti-virulent ciblant des mécanismes impliqués dans la pathogénèse, par ex le QS, la formation de biofilms, la production de toxines, d'antibiotiques...etc. **Sambanthamoorthy et al.(2011)** ont décrit la synthèse d'un nouveau dérivé de benzimidazoles (5-méthoxy-2-[(4 méthylbenzyl)sulfanyl]-1H-benzimidazole), capable d'inhiber efficacement la formation de biofilm par de multiples pathogènes bactériens, y compris *Vibrio cholerae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella boydii*, *Erwinia amylovora*, un isolat de fibrose kystique (FC) de *Pseudomonas aeruginosa* et un isolat de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) dans des conditions statiques et d'écoulement. La formation de biofilm a été inhibée sur diverses surfaces, y compris le polystyrène, le verre et les cathéters de silicone. **Tharmalingam et al. (2019)** ont exploré l'activité anti-virulence d'un nouveau dérivé du benzimidazole 4-(1,3-diméthyl-2,3-dihydro-1H-benzimidazol-2-yl)phénol (fig.20), sur un panel de gènes de virulence (*agrA*, *spa*, *codY*, *ycyG*, *spoVG*, *srrA*, *icaA*, *slsB*, *clfA*, *saeS*, *arlS*, *sasG*, *fnbA*, *fnbB*) et l'ARN III de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM). Après avoir exposé les bactéries à ce composé, l'expression des gènes de virulence a été surveillée par PCR en temps réel.

Le composé été très actif contre le gène codant pour la protéine staphylococcique A (spa) et les gènes régulateurs de la virulence agrA et codY.

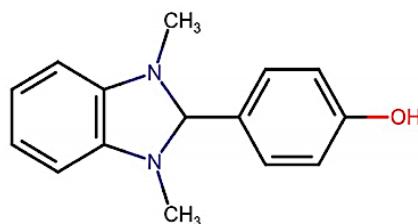


Figure 20. Le dérivé 4-(1,3-Diméthyl-2,3-dihydro-1Hbenzimidazole-2-yle)phenol
(Tharmalingam et al., 2019)

Les bactéries ont tendance de se communiquer via des signaux chimiques ou auto-inducteurs tels que l'acyl-homoserine lactone (AHL) utilisée chez les Gram-, pour surveiller leur propre densité et réguler leur comportement comme un organisme multicellulaire et l'expression de leur gène de virulence dans un processus appelé quorum sensing (QS). Différentes stratégies sont élaborées pour interférer avec le QS. Ceci est réalisé par l'inhibition de la synthèse des auto-inducteurs, la dégradation des auto-inducteurs, l'inhibition de la diffusion du signal AHL ou l'inhibition de la réception des signaux AHL. **Onem et al., (2018)** ont étudié l'effet de certains dérivés de benzimidazoles analogues de AHL (fig.21) sur l'expression des facteurs de virulence (pyocyanin, elastase, swarming motility) chez *Pseudomonas aeruginosa* PA01. Les trois dérivés présentés dans la figure ci-dessous ont montré un effet inhibiteur significatif avec une réduction de la production de la pyocyanine à 50-69%, l'élastase 19-44% et 74-80% pour le swarming.

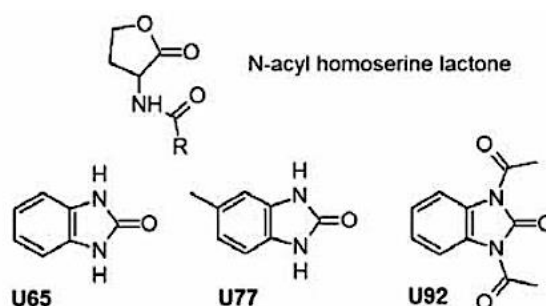


Figure 21. Structure chimique de l'AHL et ses analogues de la classe des benzimidazoles
(Onem et al., 2018).

7 Relation Structure/Activité des benzimidazoles

Les études de la relation structure-activité (SAR) des molécules bioactives jouent un rôle important pour l'identification des composantes structurales nécessaires à ses activités et la compréhension de leurs mécanismes d'action, aidant ainsi à concevoir de nouveaux agents dont l'activité biologique est améliorée et optimisée (**Bryskier, 2006**). Ainsi, les benzimidazoles peuvent présenter diverses variations structurales en apportant des modifications dans la position de leurs groupes fonctionnels. **Alasmary et al. (2015)** ont examiné l'activité antibactérienne et antifongique d'une série de 53 dérivés de benzimidazoles avec des substitutions en position 1,2 et 5. En s'appuyant sur les résultats fournis par les études SAR, les dérivés possédant un atome d'halogène (le brome ou le chlore) en position 5 et substitués par $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{NH}_2$ ou CH_2Cl en position 2, ainsi les dérivés possédant un H à la position 5 et le CH_2SH à la position 2 sont avérés les plus efficaces pour l'activité antibactérienne. Les dérivés contenant du CH_2NH_2 n'étaient pas actifs contre les bactéries, mais lorsqu'un groupe méthyle ramifié est ajouté ($\text{CH}(\text{CH}_3)\text{NH}_2$), l'activité antibactérienne est améliorée (fig.22). En outre, la présence de l'atome d'halogène (Cl, Br, F) en position 5 est un facteur important l'activité antifongique. Pour le dérivé 5-nitro, la présence de CH_2NH_2 à la position 2 a augmenté l'activité. Les dérivés N-méthylate-2-méthanolbenzimidazole étaient plus actifs que les analogues non méthylés, ce qui est observé lorsque le substituant à la position 5 était F, OMe ou NO_2 (fig.23).

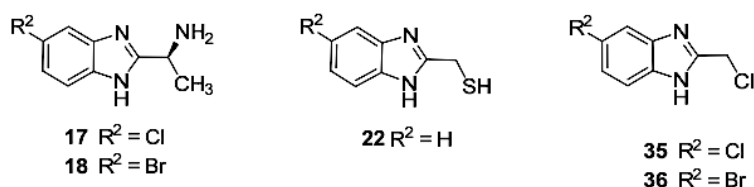


Figure 22. Les dérivés benzimidazoles à activité antibactérienne prometteuse d'après les études SAR (**Alasmary et al., 2015**).

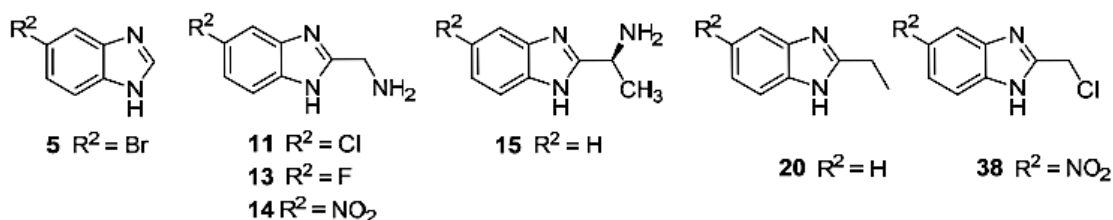


Figure 23. Les dérivés benzimidazoles à activité antifongique prometteuse d'après les études SAR (**Alasmary et al., 2015**).

Gudmundsson et al. (2009) ont décrit la synthèse d'une série de dérivés de N-(1H-benzimidazol-2-yl-méthyl)-5,6,7,8-tétrahydro-8-quinolinamine (fig.24), qui ont révélés un fort potentiel anti-HIV-1 agissant comme inhibiteurs de la CXCR4 (récepteur transmembranaire de la famille des chimiokine) avec une faible cytotoxicité. L'étude SAR a été également réalisée pour déterminer les groupes fonctionnels importants qui améliorent l'activité de ces composés.

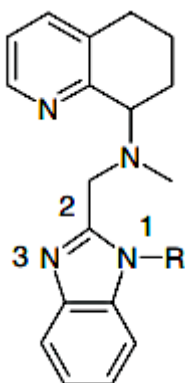


Figure 24. Structure de base des dérivés N-(1H-benzimidazol-2-yl-méthyl)-5,6,7,8-tétrahydro-8-quinolinamine à activité anti-HIV (**Gudmundsson et al., 2009**).

Le changement de la longueur de la liaison entre le N-1 du benzimidazole et l'azote de base a montré qu'une liaison à 3 carbones est optimale pour l'activité anti-HIV, tandis que les liaisons plus courtes (2 C) ou plus longues (4-5 C) réduisent considérablement l'activité. L'alkylation du groupement imino primaire a donné une bonne activité, alors que la réduction de la basicité de l'amine a montré une activité 10 fois moins importante.

Chapitre IV. Les Techniques Bioinformatiques de Docking Moléculaire.

Cas des études *in-silico*

1 Introduction

Le développement d'un nouveau médicament est un processus long et coûteux, allant de la synthèse de la molécule d'intérêt thérapeutique, de l'identification d'une cible biologique, (développement pré-clinique), les essais sur des modèles animaux, jusqu'aux essais cliniques chez les patients. Une fois sur, donc efficace et bien toléré par les patients, le médicament peut être alors commercialisé, et est effectivement surveillé au cours de la phase de pharmacovigilance, afin de détecter, évaluer, comprendre et prévenir les effets indésirables qui n'auraient pas été identifiés lors des essais cliniques (**Grosdidier, 2007**). C'est un long processus qui peut être parfois accompli par l'échec et la perte des années de travail et de ténacité, s'ajoutant aux pertes économiques qui dépassent les attendues.

Aujourd'hui, la recherche scientifique s'oriente de plus en plus vers les approches informatisées « *in-silico* ». Ces dernières années, de telles méthodes ont été utilisées principalement dans deux directions. Dans le domaine de la génomique pour l'étude des gènes et les mécanismes génétiques, et le domaine biomédical et la conception de médicaments par des méthodes de criblage virtuel et de modélisation moléculaire (le docking) pour la détermination des interactions moléculaires entre le principe actif et sa cible biologique, son profil ADME-tox (Administration-Distribution-Métabolisme-Excrétion-toxicity) qui permettent de présélectionner les médicaments les plus prometteurs et éliminer les moins performants à une étape précoce de la phase préclinique, ce qui a permis d'accélérer le taux de découvertes et de réduire le besoin d'expériences de laboratoire coûteuses ou d'essais cliniques.

2 Le criblage virtuel

2.1 Le principe

Le criblage virtuel (CV) est utilisé dans les premières phases du développement de nouveaux médicaments, et en particulier lors de l'identification de touches « hits ». Il permet de sélectionner au sein de chimiothèques variées un nombre limité de composés jugés les plus prometteurs dont le potentiel d'activité envers la cible thérapeutique visée est supérieur à celui

des autres molécules. Le recours au CV, en préalable aux examens biologiques à plus petite échelle, permet d'ajuster au mieux le nombre de tests expérimentaux en fonction des contraintes budgétaires et temporelles (**Beautrait, 2008 ; Elkaim, 2011**). Il peut également être utilisé lors de l'optimisation des leads. Dans ce cas, le criblage a pour objectif l'identification de motifs structuraux essentiels dans la liaison ligand-récepteur, et la discrimination des meilleurs composés au sein de chimiothèques orientées ayant un profil de tête de série (molécules candidats), dits "*lead-like*"(**Elkaim, 2011**).

Par ailleurs, le processus de CV comporte généralement une étape préliminaire de filtrage qui peut être prise en charge par des programmes spécialisés. Cette tâche, consiste à exclure les composés toxiques ou supposés tels ou comportant des groupements jugés trop réactifs. Ensuite, ne sont retenus que les composés obéissant à des définitions empiriques simples du profil de molécule active (caractère dit "*drug-like*"). On estime alors que les risques d'échec aux tests cliniques sont minimisés, ce qui est souvent un impératif économique (**Beautrait, 2008**).

2.2 Les différentes stratégies du criblage virtuel

Suivant la nature de l'information expérimentale disponible, on distingue deux approches distinctes pour le criblage virtuel : Le CV « structure-based » et le CV « ligand-based » (**Elkaim, 2011**).

- Le CV « ligand-based » consiste en premier lieu à classer la chimiothèque testée en fonction de la structure et les caractéristiques physico-chimiques des molécules. Ensuite, il s'agit d'identifier les molécules comportant une similarité avec les ligands connus pour être actifs sur la cible étudiée, ainsi qu'une dissimilarité avec les molécules connues pour être inactives ou présentant des caractéristiques indésirables (**Beautrait, 2008**).
- Le CV « structure-based » se rapporte souvent aux algorithmes du docking protéine-ligand et quelquefois aux recherches basées sur un motif pharmacophorique du site actif de la protéine (**Beautrait, 2008**). Ces méthodes consistent à estimer la complémentarité structurale de chaque molécule criblée avec le site actif considéré, afin d'identifier les interactions possibles au sein du site de liaison et ainsi sélectionner des molécules capables de s'y arrimer (**Elkaim, 2011**).

3 Le Docking moléculaire

3.1 Le principe

Dans le domaine de la modélisation moléculaire, le docking ou l'amarrage moléculaire peut être défini comme une méthode de prédiction précise des modes de liaison entre le ligand et leurs protéines ciblées ou récepteurs pour former un complexe stable, et qui permet de calculer leurs affinité et niveau d'activité (Boucherit, 2013 ; Brooijmans et al., 2003 ; Taylor, 2002).

3.2 Représentation générale du système de Docking moléculaire

La procédure typique du docking moléculaire est décrite dans la figure ci-dessous. L'étape la plus importante pour prédire avec précision le mode d'interaction protéine-ligand et l'obtention d'une structure précise pour le récepteur, soit par cristallographie rayons X, par RMN ou par modélisation. La conformation initiale du ligand est généralement modifiée et optimisée durant le docking, et n'est donc en principe pas très importante. Une fois les deux structures préparées, ces paramètres sont donnés au logiciel du docking choisi, et ce dernier propose un ou plusieurs modes d'interactions potentiels qui peuvent être ensuite utilisés dans de multiples façons (Grosdidier, 2007).

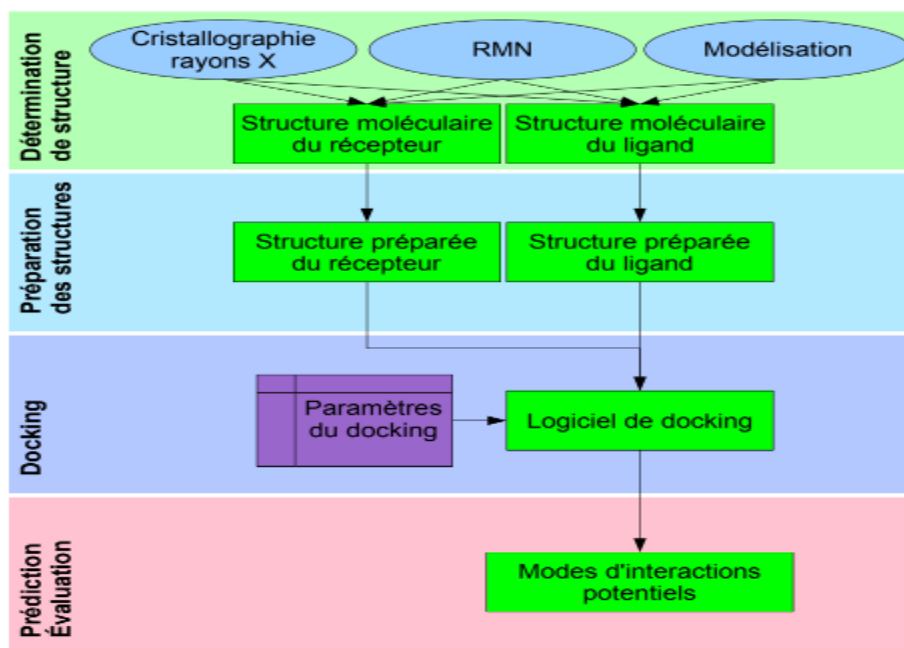


Figure 25. La procédure typique du docking moléculaire (Grosdidier, 2007).

Le docking moléculaire s'articule principalement en deux étapes. La première étape consiste à améliorer la pose (orientation et/ou conformation) afin de positionner le ligand dans le site choisi de la protéine. La seconde, fait intervenir une fonction de score qui évalue la qualité de la pose générée et le niveau d'affinité (**Beutraït, 2008 ; Martz, 2014**).

3.3 La recherche de la pose optimale

Dans un premier temps, le docking a pour objectif de prédire la pose optimale c'est-à-dire la conformation et la position que peut adopter le ligand au sein du site actif du récepteur, ainsi que la conformation du complexe, en ne retenant que celles qui représentent les modes d'interactions les plus favorables à l'activité. Ceci implique l'exploration des six degrés de liberté de translation et de rotation du ligand, ainsi que lorsque c'est possible des degrés de liberté conformationnelle existants sur le ligand ou la protéine (**Elkaim, 2011**). Il existe trois grands types du docking moléculaire qui utilisent des configurations différentes du système ligand-récepteur, qui sont générées à l'aide de modèles simplifiés pour les protéines. Le docking rigide, le docking semi-flexible, et le dernier type c'est le docking flexible.

Dans le cas des méthodes du docking rigide, le ligand et la protéine sont tous les deux considérés comme étant rigides, et la recherche de la pose optimale se limite au positionnement du ligand dans l'espace conformationnel du site actif du récepteur. Le ligand peut ainsi subir des mouvements de translations et des rotations dans chacune des trois dimensions (**Guillemain, 2012**). Les premiers logiciels du docking, parmi lesquels le logiciel DOCK, FRED permettent l'emploi de ce type d'approche (**Lagarde, 2014**). Le docking semi-flexible prend en compte la flexibilité du ligand, et la protéine est gardée rigide. Ce type de docking, permet d'explorer différentes conformations du ligand, et de tester leurs interactions avec le site actif de La protéine. Cette stratégie est notamment adoptée par les programmes FLEXX, Hammerhead et les versions flexibles du programme Dock (**Beutraït, 2008**). Pour les méthodes de docking flexible, prenant en compte explicitement la flexibilité de la protéine, ou au moins son site actif et celle de ligand afin d'optimiser au mieux l'interaction entre les deux entités.

La catégorie du docking la plus rapide est sans aucun doute le docking rigide, historiquement le premier conçu. Les stratégies qui explorent la flexibilité du ligand et/ou la protéine cible donnent des résultats plus précis (**Hazan, 2008**).

3.4 L'évaluation du score des poses

La fonction du score est utilisée dans le cadre du docking pour pouvoir distinguer parmi les différentes poses générées pour un ligand, celles qui correspondent aux modes de liaison les plus représentatifs de la reconnaissance moléculaire (**Beautrait, 2008**).

C'est globalement des calculs mathématiques de l'énergie libre résultant du passage de la forme libre de la protéine et du ligand à l'association sous forme de complexe, ce qui permettra d'estimer l'affinité de la liaison entre les deux molécules et de classer les différentes poses proposées par la première étape du docking pour identifier et retenir les meilleurs d'entre eux (**Beautrait, 2008**).

Matériel et méthodes

Matériel et méthodes

Matériel et méthodes

L'expérimentation de ce travail de mémoire s'est étalée sur une période de 6 mois (mars-septembre 2020). L'ensemble des analyses ont été effectuées au sein du laboratoire de synthèse organique et RMN, du centre de recherche scientifique et technique en analyses physico-chimiques CRAPC.

Les objectifs tracés au court de cette étude sont :

- L'extraction des HEs, et caractérisation physicochimique par GC/MS
- Réaction d'hémi-synthèse
- Caractérisation physicochimique des produits de la réaction par spectroscopie RMN
- Évaluation de l'activité antioxydante et antibactérienne
- Évaluation de la relation structure/activité des molécules par un logiciel du docking moléculaire.

1 Matériel

1.1 Solvants et réactifs chimique

Les produits chimiques utilisés lors de cette étude sont cités dans le tableau suivant :

Table 1. Liste des produits chimiques utilisés.

Solvants	Formule chimique	Référence	Réactifs chimiques	Formule chimique	Référence
Ethanol	CH ₃ -COOH	Sigma-Aldrich	Acid benzoïque		Sigma-Aldrich
Chloroforme	CHCl ₃		O-phylene diamine	C ₆ H ₄ (NH ₂) ₂	
Méthanol	CH ₃ OH		(OPA)		
Dichlorométhane	CH ₂ Cl ₂		Salicyaldéhyde		
Tampon phosphate (pH 6,6)			DPPH	C ₁₈ H ₁₂ N ₅ O ₆	
Ferricyanure de potassium	K ₃ Fe(CN) ₆		Acide trichloracétique		
Tampon Tris-HCl			(ATC)		
Solution TSP-d4			Chlorure ferrique	FeCl ₃	
DMSO			β-carotène		
			Acide linoléique	C ₁₈ H ₃₂ O	
			Tween 80		
			Sulfate ferreux	FeSO ₄	
			Acide ascorbique	C ₆ H ₈ O ₆	
			Acide thiobarbiturique	C ₄ H ₄ N ₂	
			(TBA)		
			p-iodonitrotetrazolium		
			(INT)		

1.2 Matériel biologique

1.2.1 La cannelle

La cannelle est un arbre aromatique originaire du Sri Lanka et du sud de l'Inde connue sous le nom de cannelle de Ceylan ou « Arbre à cannelle », aussi appelé cannellier domestique, (Barbier C., 2014). En effet, le nom de cannelle est donné à un certain nombre d'écorces aromatiques de la famille des Lauracées du genre *Cinnamomum*. Celle de Ceylan porte le nom binomial de *Cinnamomum zeylanicum* ou *Cinnamomum verum* (Paul, 2001)

Tableau I. Classification de la cannelle (Paul, 2001)

Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Magnoliidae
Ordre	Laurales
Famille	Lauraceae
Genre	<i>Cinnamomum</i>
Espèce	<i>C. zeylanicum</i> ou <i>C. verum</i> ,
Nom commun	Cannelle de Ceylan
Nom en anglais	Cinnamon

La cannelle est une épice usage culinaire et médicinal reconnue mondialement. Indiquée traditionnellement contre le rhume, la grippe et les troubles digestifs, demeurent toujours valables aujourd'hui (Paule, 2001). La cannelle du commerce *C. verum* fournit divers types d'HE en fonction de la partie de la plante utilisée (la feuille, l'écorce de tige, et l'écorce des racines). La cinnamaldéhyde est la principale composante de l'HE de l'écorce de tige (environ 75 % du total), (fig. 26) (Senanayake et al., 1972).

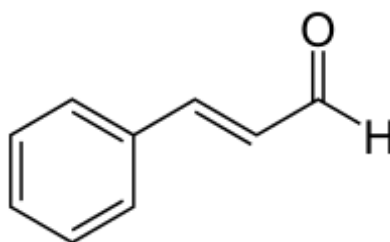


Figure 26. Structure chimique de la cinnamaldéhyde (Senanayake et al., 1972).

1.2.2 La citronnelle

La citronnelle ou *Cymbopogon citratus* est une plante herbacée originaire de l'Inde, cultivés dans l'humidité, les régions tropicales et subtropicales du monde (Seaforth et al., 2008). Elle se présente avec de longue feuille verte avec pointes gracieusement tombante et libèrent un arôme d'agrumes (citron) une fois écrasées (fig. 27) (Shahet al.,2011)



Figure 27. *Cymbopogon citratus* avec ses longue feuilles (Shah et al., 2011).

Tableau II. Classification de la citronnelle (Shah et al., 2011).

Règne	Plantae
Division	Magnoliophyta
Classe	Liliopsida
Ordre	Poales
Famille	Poaceae
Genre	<i>Cymbopogon</i>
Espèce	<i>Cymbopogon citratus</i>

La composition chimique de l'HE de la citronnelle varie selon l'origine géographique, on trouve principalement des isomères *trans* et *cis* du citral (de 72,60% à 79%) (fig. 28) (Ralambondrainy, 2018).

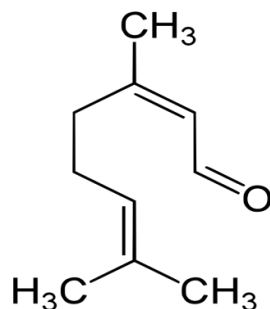


Figure 28. Structure chimique du citral (Ralambondrainy, 2018).

2 Méthodes

2.1 Extraction de l'huile essentielle

La cannelle utilisée dans cette expérimentation a été apportée d'un point de vente local. La citronnelle a été récoltée de la région de Tipaza, l'Algérie.

Un séchage et broyage moyen des plantes étudiées sont procédé comme étape préparatoire pour l'extraction de l'HE. L'extraction de l'HE est réalisée au moyen d'un hydrodistillateur type Clevenger en système fermé permettant une extraction en recyclage continu afin de maintenir le rapport plante/eau à son niveau initial (fig. 29). Une quantité de 100 g de matière végétale moyennement broyée est placée dans un ballon à fond rond de 1L avec 500 ml de l'eau distillée. Le tout est ensuite porté à ébullition pendant 3h.

Sous l'effet de la chaleur les cellules végétales s'éclatent et libèrent les molécules odorantes qui y sont contenues. Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur de l'eau un mélange azéotropique. Les vapeurs sont condensées par le réfrigérant maintenu à 17°C au moyen d'un thermostat type Wisecircu® WCR - P 8 DHWCR00208. L'huile essentielle ainsi obtenue se sépare de l'eau par différence de densité et ensuite récupérée dans un Vial ombré après élimination de l'eau.

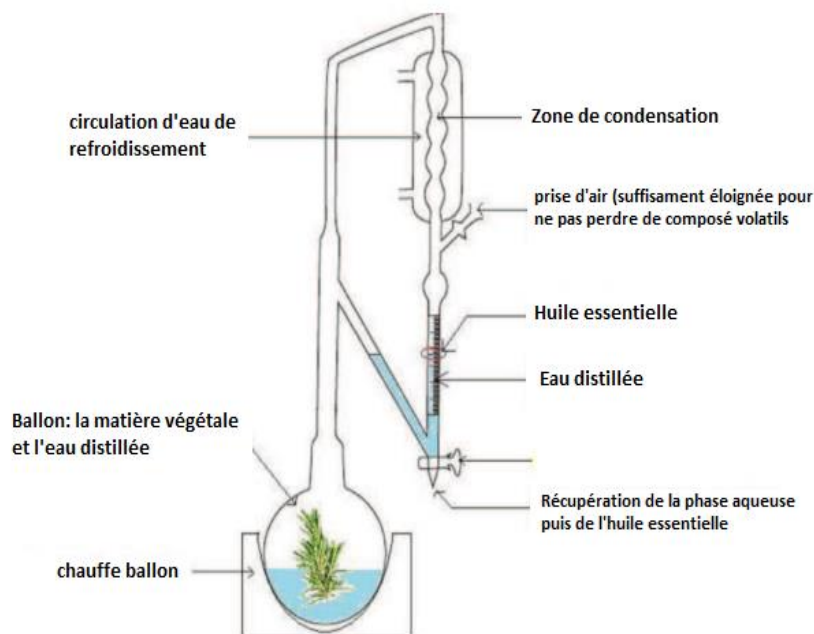


Figure 29. Hydrodistillateur en type Clevenger en système fermé

Le rendement d'extraction est mesuré selon l'équation suivante :

$$REp\% : (mMS - mE / mMS) \times 100 \quad \text{ou} \quad REh\% : (mMG - mE / mMG) \times 100$$

- REp : Rendement d'extraction des plantes en (%)
- REH : Rendement d'extraction de l'huile en (%)
- mMS : Masse de matière sèche en (g)
- mMG : Masse de matière grasse en (g)
- mE : Masse d'extrait en (g)

2.2 Analyses GC-MS

Les HE ont été analysées par GCMS au moyen d'un système Hewlett Packard-6890 équipé avec une colonne capillaire fusionnée HP-5MS (30 m x 0,25 mm ; épaisseur de film 0,25 µm), directement couplé à un détecteur de masse sélectif Hewlett Packard-5973. De l'hélium (1 ml / min) a été utilisé comme gaz vecteur ; programme de température du four : 60 ° C-300 ° C à 3 ° C / min; sans division pendant 1,50 min; volume d'échantillon 2 µL de la solution d'huile. La température de l'Injecteur et le détecteur était de 240 ° C. EIMS : énergie électronique, 70 eV; température de la source d'ions et pièces de raccordement: 180 ° C. Les identifications ont été faites par correspondance de leurs spectres de masse et le temps de rétention avec ceux enregistrés dans la bibliothèque MS et par comparaison des indices de rétention et les spectres de masse avec les données de la littérature. L'hydrogène a été utilisé comme gaz porteur ajusté à une vitesse linéaire de 32 cm / s (mesuré à 100 ° C). Le débit divisé a été ajusté pour donner un rapport de 20: 1 et un septum de balayage était une constante de 10 ml / min. Le four a été programmé comme suit: 60 ° C-240 ° C à 3 ° C / min. Les échantillons ont été injectés selon la technique splitless: 2 µL de la solution d'huile dans l'hexane (2: 1000). La température de l'injecteur et du détecteur était de 250 ° C. Le GC était équipé avec FID et connecté à un intégrateur électronique HP 5896 Series II. Le pourcentage de la composition des échantillons d'huile a été calculé à partir des zones de pic GC sans utiliser correction des facteurs de réponse.

2.3 Synthèse de trois dérivés 2-substitués-1H-benzimidazole

Des études scientifiques récentes ont révélé l'importance du noyau benzimidazole au niveau des activités thérapeutiques des molécules. Parmi les groupements testés, l'amine est considérée comme la plus polyvalente. Notamment, le 2-aminobenzimidazole est trouvé dans un certain nombre de molécules biologiquement actives comme les antiviraux, antihistaminiques, et antibactériens... C'est pourquoi l'étude en cours visera de développer de nouvelles méthodes de synthèse de ce noyau et de ses dérivés en se basant sur des réactions rapides (Click chemistry) sans recours aux catalyseurs chimiques. Cette approche de synthèse complète est pertinente pour la découverte de médicaments et va dans un premier lieu suscité un intérêt considérable.

○ Préparation du milieu réactionnel

Au niveau structural, les noyaux benzimidazoles sont des molécules assez simples et ne contient que deux parties principales : la partie benzénique et la partie guanidinique diversement substituées (fig.31). Les réactions de synthèses des noyaux benzimidazoles ont été effectuées par mesures équimolaires selon le nombre et position des fonctions chimiques réactionnelles des aldéhydes, alors pour de telles réactions il suffit de déterminer exactement le positionnement chimique avant pour en déduire la masse (nombre de moles \times masse molaire) des matières primitivement mélangées.

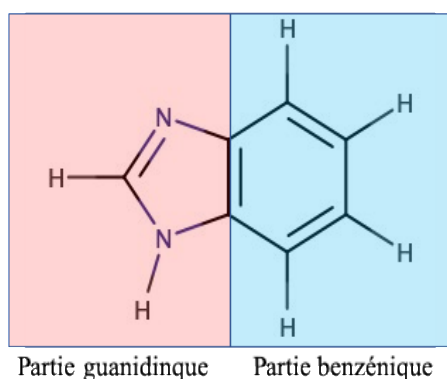


Figure 30. Représentation du noyau benzimidazole

○ **Rection de l'hémi-synthèse**

Le dérivé aminé o-phénylènediamine est ajouté à une solution éthanolique (15 mL) puis la salicylaldehyde, la cinnamaldéhyde, le citral (1 mmol de l'aldéhyde correspondant, calculée sur la base de sa masse % correspondante, environ 0,5mL) sont ajoutés sous agitation constante à température ambiante, et la réaction a été laissée pendant 12 h sous reflux. Les cristaux de composés 1b-3b se sont formés progressivement dans le milieu réactionnel. Les précipités de 1b-3b ont été filtrés et lavés avec de l'éthanol après le temps requis puis purifiés par CCM et chromatographie sur colonne. Dans la réaction de synthèse, l'hétérocycle 1H-benzimidazole substitués en position 2 fut synthétisé en faisant réagir le groupement diamine de l'OPA avec la fonction aldéhyde -COH de l'aldéhyde correspondant. La synthèse des benzimidazoles sera correspondante au type de l'aldéhyde mis en contact, mais la réaction pourra offrir divers substituants qui peuvent avoir un impact sur l'activité biologique.

Matériel et méthodes

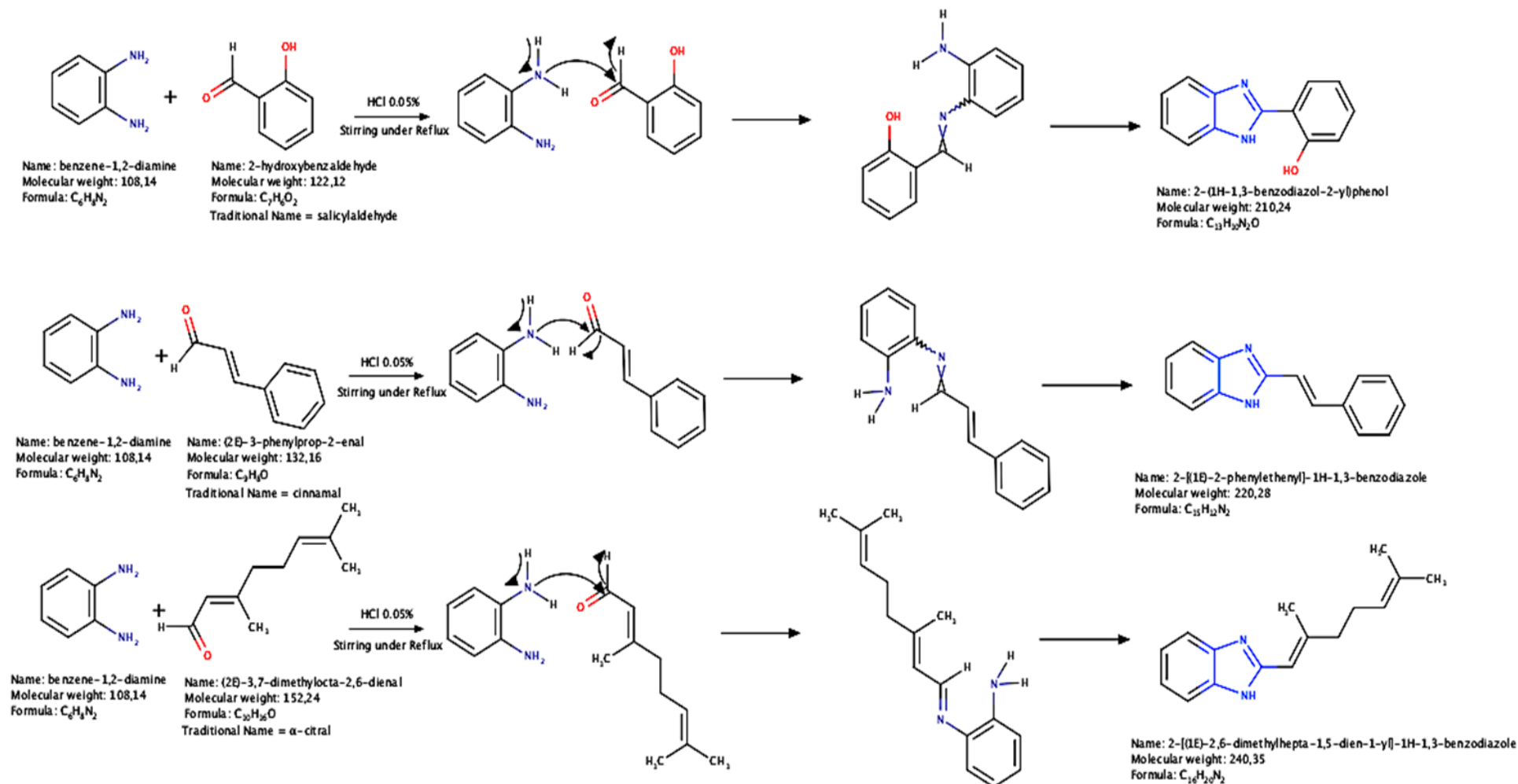


Figure 31. Mécanisme réactionnel de synthèse des dérivés du benzimidazole à partir de l'O-phénylènediamine et des aldéhydes étudiés 1b, 2b, et 3b

2.4 Fractionnement et Purification

2.4.1 Chromatographie sur colonne

La chromatographie sur colonne sert à séparer/fractionner des produits, soit à purifier un produit de réaction. C'est la méthode standard de purification dans un laboratoire de chimie organique. C'est une méthode préparative, elle permet de purifier 50 mg à environ 20 g en laboratoire, et jusqu'à 1 kg en industrie. La séparation est effectuée par gravité et on utilise pour cela des particules de silice de 70 à 200 μm où le solvant s'écoule au goutte-à-goutte.

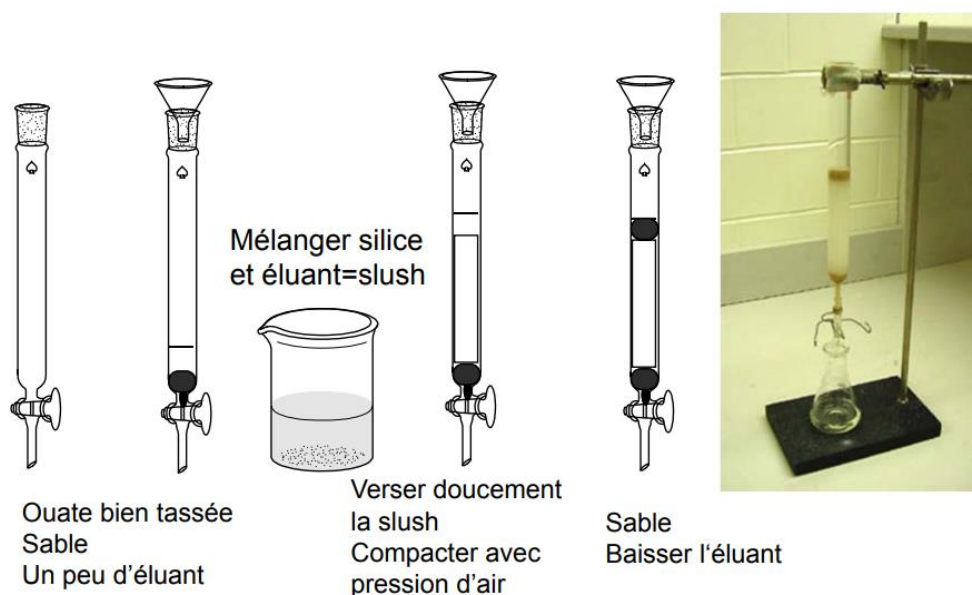


Figure 32. Chromatographie sur colonne

Préparation de la colonne et Dépôt du produit :

Il s'effectue robinet fermé, à la pipette pasteur de façon homogène sur les bords de la colonne, le plus bas possible. On choisit le solvant avec le plus petit volume possible en se basant sur l'éluant de départ utilisé en CCM pour avoir une séparation distincte. Le dépôt doit par contre être absorbé intégralement avant l'ajout du solvant d'éluant.

Pour le dépôt de produit deux possibilités s'offrent si le produit brut est solide:

- le solubiliser dans l'éluant et l'ajouter tel que décrit précédemment
- faire une imprégnation sur silice: mélanger le produit en solution avec ~ 5 x sa masse de silice. Évaporer à sec et additionner ce solide sur le haut de la colonne avant de mettre le sable. On utilise souvent cette technique si le produit brut n'est pas soluble dans l'éluant choisi.

Mode opératoire

- On amène le niveau d'éluant au niveau de la surface du sable. On peut alors déposer délicatement la solution du milieu réactionnel en haut de colonne à la pipette Pasteur afin de ne pas perturber la surface de silice.
- On ouvre le robinet pour que les colorants arrivent au niveau de la silice. On rajoute quelques millilitres d'éluant et on ouvre de nouveau le robinet afin de s'assurer que toute la solution soit en tête de la colonne de silice.
- On peut alors ajouter l'éluant. Les premiers millilitres doivent toujours être ajoutés avec précaution à la pipette pasteur afin de ne pas perturber la surface de silice. Ensuite, on peut ajouter l'éluant plus rapidement en le versant directement dans la colonne.
- L'éluant utilisé ici dans un premier temps est le dichlorométhane qui permet l'élution de la fraction non-polaire suivi de l'éthanol et chloroforme, qui séparent la fraction fortement retenu par la silice.
- Après avoir récupéré une fraction, on change d'éluant pour récupérer l'autre et ainsi de suite.
- On utilise ici de l'éthanol pour récupérer la faction majoritaire. En effet, les molécules produites ont peu d'affinité pour la silice par rapport à l'éluant, qu'on utilise « l'éthanol ». C'est pourquoi elle est entraînée facilement.
- Les molécules de benzimidazole produites sont entraînées par la phase mobile, et ils sont récupéré dans des béchers de 250 mL. Il est souvent utile de réaliser des chromatographies sur couche mince sur chaque tube pour vérifier où sont les composés à séparer, dans le cas où ceux-ci ne sont pas colorés.
- Regrouper les solutions qui contiennent le même produit pur.
- Concentrer à l'évaporateur rotatif.
- Sécher à la pompe mécanique.
- Calculer le rendement de la réaction.

2.5 Analyse structurale

2.5.1 Analyse par RMN ¹H proton

Dans un tube RMN de 5 mm de diamètre, on introduit 500 uL d'échantillon (molécules de synthèse ou solution de standards) et un tube porte-capillaire contenant une solution de TSP-d4 dosée à 2,1 mmol proton/L. Cette solution sert de référence pour les déplacements chimiques (δ 'H = 0,00 ppm) et permet la quantification des composés par intégration de leurs pics relativement au TSP-d4. Une séquence de pré-saturation est appliquée pour atténuer le signal de l'eau. Selon la concentration des échantillons, 128 à 512 accumulations ont été réalisées sur une largeur spectrale de 3200 Hz. Avant transformation de Fourier, une fonction exponentielle correspondant à un élargissement de 0,3 Hz est appliquée. L'utilisation du logiciel Topspin 2.6 NMR de Brüker a servi au traitement des données.

2.6 Évaluation de l'activité antioxydante

Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation et la nature diversifiée des antioxydants, il n'y a pas une méthode universelle par laquelle l'activité antioxydante peut être mesurée quantitativement d'une façon bien précise. Le plus souvent il faut combiner les réponses de tests différents et complémentaires pour avoir une indication sur la capacité antioxydante de l'échantillon à tester (**Tarbart et al., 2009**). Lors de cette étude on a utilisé quatre tests à savoir : le test DPPH, le pouvoir réducteur du fer, le test du blanchiment du β -carotène et le test TBARS.

○ Préparation de la gamme des concentrations

Les molécules sont dissoutes dans l'éthanol avec un volume bien connu pour fixer une concentration initiale [C=10mg/ml] Diluée à différentes concentrations jusqu'à la détermination de l'EC₅₀ (Concentration fournissant 50% d'activité antioxydante ou 0,5 d'absorbance dans le dosage du pouvoir réducteur ; Exprimée en g / ml).

➤ Test au DPPH (**Hatano et al., 1988**)

• Principe

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (α,α -diphényl- β -picrylhydrazyle) fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydant des composés phénoliques (**Brand et al., 1995**). Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote. La molécule DPPH est un radical stable grâce à la

Matériel et méthodes

délocalisation de son électron célibataire autour de la molécule empêche ainsi sa polymérisation. Ce qui est le cas de la plupart des radicaux. La délocalisation de l'électron est responsable d'un développement d'une couleur violet foncé (**Cristina et al., 2009**).

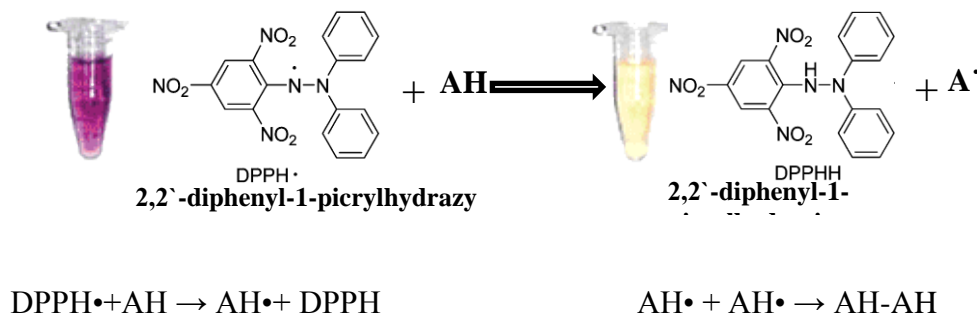


Figure 33. Réaction de test DPPH (2,2 Diphenyl 1 picrylhydrazyl)(Congo, 2012).

L'addition du radical DPPH à une solution contenant un composé potentiellement antioxydant et pouvant céder un atome d'hydrogène entraîne une diminution de la coloration violette caractéristique de l'apparition de la forme réduite du DPPH (**Cristina et al., 2009**). Au terme de la réaction, il persiste une légère coloration jaune due au groupement picryl résiduel.

- **Mode opératoire** (Ziani et al., 2015)

Cette méthode a été réalisée en utilisant un lecteur de microplaque ELX800 (Bio-Tek). On dépose 30µl de chaque concentration des composés aux puits des microplaques 96 (en trois répétitions) où le mélange réactionnel se forme après l'ajout de 270µl de la solution du DPPH (60µM). Le mélange a été laissé à l'obscurité pendant 60 minutes. La réduction du radical DPPH est déterminée en mesurant l'absorption à 515 nm. L'activité de piégeage du radical DPPH (RSA) est exprimée en pourcentage de DPPH en utilisant l'équation:

$$\% \text{ RSA} = [(A_{\text{DPPH}} - A_{\text{S}}) / A_{\text{DPPH}}] \times 100, \text{ où :}$$

- AS est l'absorbance de la solution lorsque l'extrait a été ajouté avec une concentration donnée, et A_{DPPH} est l'absorbance de la solution de DPPH.

➤ **Test de la réduction du fer**

- **Principe**

Le pouvoir réducteur du fer des molécules est déterminé se basant sur la réduction de fer ferrique en fer ferreux par les antioxydants ce qui donne une couleur bleue.

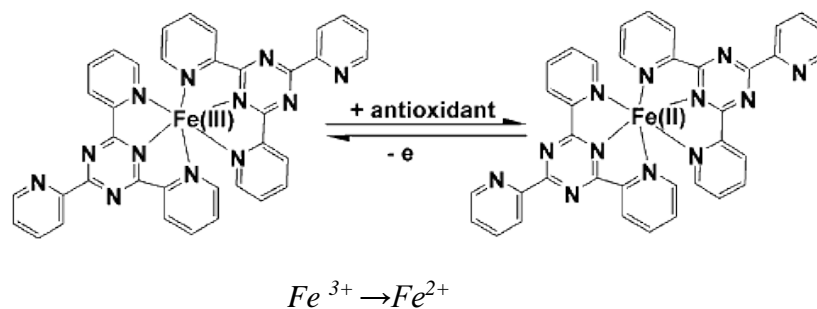


Figure 34. Schéma de la réaction de réduction de fer (Prior et al., 2005).

- **Mode opératoire** (Ziani et al., 2015)

Cette méthode a été réalisée en utilisant le lecteur de microplaque décrit ci-dessus, où 0,5 ml de la solution à différentes concentrations est mélangé avec 0,5ml d'une solution tampon phosphate (pH 6,6) et 0,5ml d'une solution de ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ à 1%. L'ensemble est incubé au bain-marie à 50°C pendant 20 min. 0,5 ml d'acide trichloracétique (ATC) est ajoutée pour stopper la réaction. On transfère 0,8ml du mélange dans les puits des microplaques 48 et on ajuste avec le même volume en eau distillée. A la fin on additionne 0,16 ml de $FeCl_3$ (Chlorure ferrique) à 0,1 %. L'absorbance est mesurée à 690 nm.

- **Test de blanchiment de β -carotène/acide linoléique**

- **Principe** :

C'est l'une des méthodes complémentaires utilisées pour le criblage de substances antioxydantes. Elle est basée sur le principe que l'acide gras insaturé, acide linoléique, s'oxyde spontanément avec les espèces réactives de l'oxygène "Reactive Oxygen Species" (ROS) présentes dans l'eau riche en oxygène. Alors, les produits de réaction déclenchent la transformation du β -carotène en sa forme incolore. Le degré de décoloration est mesuré par spectrophotométrie et utilisé comme une estimation de l'activité antioxydante.

- **Mode opératoire** : (Ziani et al., 2015)

Une solution stock de β -carotène a été préparée en dissolvant du β -carotène (2 mg) dans du chloroforme (10 ml). Un volume de cette solution a été pipeté dans un ballon à fond rond et mis à l'évaporation sous vide pour éliminer le chloroforme à 40 ° C afin d'obtenir 0,5 mg de β -carotène, on ajoute 40 mg d'acide linoléique et de l'émulsifiant Tween 80 (400 mg) et (100 ml) d'eau distillée au même ballon sous agitation vigoureuse. Des aliquotes (4,8 ml) de cette émulsion ont été transférées dans différents tubes à essai contenant (0,2 ml) de différentes concentrations des molécules. À ce moment on procède à la lecture de

l'absorbance du temps zéro à 470 nm (spectrophotomètre AnalytikJena). Après vortex les tubes sont déposés à 50 ° C pour effectuer la deuxième lecture après 2h d'incubation. L'inhibition du blanchiment b-carotène était calculée en utilisant l'équation suivante :

$$I (\%) = (\text{Abs } \beta\text{-carotène } t_{2h} / \text{Abs Initiale } t_0) \times 100$$

➤ **Test Thiobarbituricacid RS**

▪ **Principe :**

On a utilisé un essai modifié d'espèces réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS) pour mesurer le peroxyde de lipide formé, en utilisant le cerveau du porc comme milieu riches en lipides. Les valeurs d'essai TBARS sont habituellement rapportées dans le malonaldéhyde (MDA) équivalent, un composé qui résulte de la décomposition des peroxydes lipidiques d'acides gras polyinsaturés. Ce dosage est basé sur la réaction d'un réactif chromogène, l'acide 2-thiobarbiturique, avec le MDA à 25 ° C. Une molécule de MDA réagit avec 2 molécules d'acide 2-thiobarbiturique via une condensation de type Condensation Knoevenagel pour obtenir un chromophore avec une absorbance maximale à 532 nm, comme indiqué ci-dessous sur la figure 35.

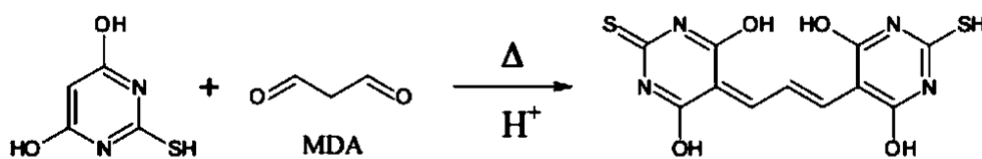


Figure 35. Test de l'acide 2-thiobarbiturique

▪ **Mode opératoire (Ziani et al., 2015)**

Ce test est réalisé sur une partie du cerveau du mouton de poids corporel 50 g, disséqué et homogénéisé avec un Polytron dans du tampon Tris-HCl (20 mM, pH 7,4) pour former un homogénat de tissu cérébral 1: 2 (p / v) qui est centrifugé à 3000 trm (Centrifugeuse réfrigérée Centorion K24OR) pendant 10 min. Un volume de (0,1 ml) du surnageant a été incubé avec les différentes concentrations des extraits (0,2 ml) en présence de FeSO4 (10 ml, 0,1 ml) et d'acide ascorbique (0,1 mM; 0,1 ml) à 37 ° C pendant 1 h. La réaction a été arrêtée par l'addition de trichloracétique (28% en poids / volume, 0,5 ml), puis de l'acide thiobarbiturique (TBA, 2%, poids / volume, 0,38 ml), et le mélange a ensuite été chauffé à 80 ° C pendant 20 minutes. Après centrifugation à 3000 trm pendant 10 min pour éliminer la protéine précipitée, l'intensité de couleur du malondialdéhyde (MDA) -TBA dans le surnageant a été mesurée par son absorbance à 532 nm. Le taux d'inhibition (%) a été calculé en utilisant la formule suivante :

$$\text{Rapport d'inhibition (\%)} = [(A-B) / A] \times 100\%, \text{ où}$$

A et B étaient l'absorbance du témoin et la solution composée, respectivement.

2.1 Évaluation de l'activité antibactérienne

2.1.1 Microorganismes et conditions de culture.

Les souches microbiennes testées étaient des souches de références. Trois bactéries à Gram- : *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* et une bactérie à Gram+ *Staphylococcus aureus* et une levure *Candida albicans*. Toutes les souches ont été identifiées et caractérisées pour confirmer l'espèce bactérienne.

2.1.2 Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI).

Une méthode de micro-dilution et l'essai colorimétrique rapide du chlorure de p-iodonitrotétrazolium (INT) ont été utilisés pour déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI). Brièvement, des solutions mères de 100 mg/mL ont été préparées pour chaque composé (1b, 2b et 3b), et 100 µL de chaque solution mère (100 mg/mL) ont été dilués dans 400 µL de MHB (bouillon Mueller Hinton) ou de TSB (bouillon Trypton Soja) selon les exigences bactériennes (ce qui donne une solution de 20 mg/mL). Ensuite, 200 µL de cette solution des molécules diluées dans le DMSO ont été ajoutés au premier puits d'une microplaque (microplaque à 96 puits) et 100 µL du premier puits ont été pipetés vers d'autres puits contenant 100 µL de milieux faisant des dilutions successives.

Par la suite, 10 µL d'inoculum ($1,5 \cdot 10^8$ UFC/mL) de cultures de bactéries jeunes ont été ajoutés à tous les puits contenant les concentrations d'essai de l'ordre de 20 à 0,156 mg/mL. Trois témoins négatifs ont été préparés (un avec MHB/TSB, un autre avec l'extrait et le troisième avec le milieu, l'inoculum et l'antibiotique). La microplaque est ensuite incubée à 37°C pendant 24h.

La CMI des échantillons a été déterminée après l'ajout de INT (0,2 mg/mL, 40 µL) et après incubation à 37 °C dans l'étuve (Jouan, Berlin, Allemagne) pendant 30 minutes, où les microorganismes viables ont réduit le colorant jaune à rose. La CMI a été définie comme la plus faible concentration d'extrait qui a empêché ce changement et a permis l'inhibition complète de la croissance bactérienne.

2.2 Le docking

2.2.1 AutoDock

C'est un ensemble de procédures, dont le but de prédire l'interaction entre un ligand et une protéine cible et il peut-être utilise pour trouver un site actif pour une protéine cible, en cherchant la structure entière. AutoDock est recommandé pour effectuer le docking avec des petites molécules.

Afin de pouvoir réaliser le criblage virtuel avec AutoDock, un ensemble d'outils nécessaires a utilisé :

- ✓ La version AutoDock4.2
 - AutoDock
 - AutoGrid
 - AutoDockTools
 - Python 2.7
- ✓ Les fichiers nécessaires téléchargeables depuis le site de base de données de protéine www.pdb.com

La procédure de docking avec AutoDock se décompose en deux étapes principales :

- Génération de carte d'interactions du récepteur avec AutoGrid
- Docking (amarrage) du ligand au récepteur avec AutoDock

Nous utiliserons l'interface graphique AutoDockTools (ADT) pour faciliter la préparation des fichiers, pour effectuer le docking et visualiser les résultats. Les étapes sont décrites ci-dessous :

1. Préparation des fichiers de coordination en utilisant AutoDockTools
2. Le calcul d'affinités des atomes avec AutoGrid
3. Le docking de ligands avec AutoDock
4. Analyse des résultats avec AutoDockTools 2

2.2.2 Étapes AutoDock

AutoDock a besoin de connaître les types, les charges et la liste de liaison de chaque atome, afin de pouvoir effectuer la procédure de docking. Tout d'abord, il faut chercher dans la base de données PDB (Protein Data Bank) les fichiers pdb pour la protéine et le

ligand. Il existe deux façons pour la préparation des fichiers d'entrées, soit on les télécharge séparément, soit on télécharge un fichier complexe protéine-ligand, et après on extrait les coordonnées de protéine et de ligand dans des fichiers séparés. Et pour faire cela, on utilise la commande egrep sous linux.

- Pour extraire les protéines, qui sont des lignes qui commencent par le mot ATOM. et chaque chaîne de protéine se termine par une ligne qui commence par TER egrep `"^(ATOM|TER)" file.pdb > protein.pdb`.
- Tandis que, pour extraire le ligand, qui sont des lignes qui commencent par le mot HETATM egrep `"^HETATM file.pdb | grep HOH* -v > ligand.pdb`, nous avons choisi les fichiers d'entrées 1DY6.pdb pour le récepteur et impin.pdb pour le ligand, pour dérouler la simulation avec AutoDockTools.
- Après avoir extrait ou téléchargé les fichiers, on va lancer l'outil AutoDockTools (ADT) avec la commande `adt`.

2.2.3 Protéine choisie pour le Docking-La thymidylate kinase (TMK)

La thymidylate kinase des bactéries à Gram positive (TMK) est une enzyme clé pour la synthèse de l'ADN par ces bactéries en phosphorylant le désoxythymidine monophosphate (dTMP) au désoxythymidine diphosphate (dTDP). Actuellement, il est nécessaire de donner une importance majeure à la recherche de nouvelles molécules qui évitent les mécanismes de résistance existants, pour cela la thymidylate kinase est devenue une nouvelle cible de médicament anti *S. aureus* (Martínez-Botella et al., 2013 ; Keating et al., 2012).

Résultats et discussion

Résultats et discussion

Résultats et discussion

Lors de cette étude on a choisi de réaliser une chromatographie **GCMS** afin d'identifier les différentes espèces chimiques pour ensuite voir si les huiles essentielles peuvent être utilisées en héli-synthèse pour le développement de nouvelles molécules bioactives.

Dans un premier temps, on va d'abord mettre en évidence les molécules qui entrent dans la composition des huiles essentielles de la cannelle et la citronnelle, et celles qu'on va cibler pour fabriquer les nouvelles molécules biologiquement actives.

D'après les recherches, les deux molécules présentes en majorité dans l'huile essentielle de la cannelle ce sont la cinnamaldéhyde (~70-90%) et l'acétate de cinnamyle (~3-5%). Cependant, la citronnelle est riche en citral (~30-45%) et le myrcène (~10-15%).

1 Profils GCMS des huiles essentielles de la cannelle et la citronnelle

Le profil GCMS de l'HE de cannelle présentait des variations dans les constituants chimiques (Tableau IV). Le chromatogramme GCMS a montré que le composé majeur trouvé dans toute l'huile de cannelle était du cinnamaldéhyde à 85%. Puis le reste des composés sont des éléments mineurs présent en très faible quantité. Les autres aldéhydes tel que le trans-cinnamaldéhyde, le cuminaldéhyde, le cis-cinnamaldéhyde et le benzaldéhyde ont également été détectés en très faible quantité. Cependant, l'ordre décroissant des composés présent dans l'huile de cannelle entière est indiqué comme suit: - cinnamaldéhyde (85%)>Linalool (2,4%)>Eugenol (2,2%).

L'aldéhyde cinnamique ou (cinnamaldéhyde) a pour formule : C_9H_8O . C'est un exemple d'aldéhyde parfumé. Il est le composant principal de l'essence de cannelle et se trouve à l'état naturel dans le tronc du cannelier de Ceylan, du camphrier et du cannelier de Chine (Casse). Chimiquement, il est obtenu par synthèse à partir du benzaldéhyde C_6H_5CHO et d'acétaldéhyde CH_3CHO ou par réduction de l'acide cinnamique. Il a une structure plane en raison d'une double liaison conjuguée (alcène). C'est un liquide jaune, plus visqueux que l'eau, à forte odeur de cannelle. Le cinnamaldéhyde diminue l'activité d'un enzyme important dans le déclenchement des réactions inflammatoires ou allergiques et comporte des propriétés antiseptiques: antifongiques ou même antiviraux.

Tableau III. Composition chimique de l'HE de la cannelle

<i>Composé</i>	Pourcentage %
α -Pinene	0,6
Camphene	0,2
β -Pinene	0,1
Sabinene	0,02
delta 3Carene	0,03
Myrcène	0,1
α -Phellandrene	0,6
α -Terpinene	0,4
Limonene	0,5
1 : 8-Cineole	2
cis-Ocimene	0,03
γ -Terpinene	0,03
p-Cymene	1,1
Terpinolène	0,1
Furfural	0,03
oxyde de trans-linalol	0,1
α -Ylangene	0,3
Benzaldéhyde	0,3
Eucalyptol	0,26
Linalool	2,4
Acétate de bornyle	0,1
Terpinen-4-ol	0,4
Bornéol	0,02
α -Terpineol	0,7
Piperitone	0,1
Cuminaldehyde	0,04
Hydrocinnamaldehyde	0,4
Acétate de phényléthyle	0,1
Geraniol	0,1
Acétate de 2-phénylpropyle	0,1
Cinnamaldehyde	85
Eugenol	2,2
Acétylénol	0,2
Farnesol	0,03
Isoeugénol	0,02
Benzylbenzoate	0,7
Rendement	3,8%
Aspect	Liquide
Couleur	Jaune/Orange

Tableau IV. Composition chimique de l'HE de la citronnelle

<i>Composé</i>	Pourcentage %
α -Pinene	0.01
6-methyl-5-Hepten-2-one	1.25
Myrcene	15.41
(Z)- β -Ocimene	0.69
(E)- β -Ocimene	0.34
6,7-Epoxyocimene	0.27
Linalool	1.29
Citronellal	0.12
Rosefuranepoxide	0.07
Nerol	0.34
β -Citronellol	0.34
Neral	13.31
Geraniol	3.05
Citral	49.53
2-Undecanone	0.53
Geranylacetate	0.24
(E)-Caryophyllene	0.15
α -(E)-Bergamotene	0.13
2-Tridecanone	0.37
δ -Cadinene	0.10
5-epi-7-epi-a-Eudesmol	0.12
α -Cadinol	0.28
Rendement	1,9%
Aspect	Liquide
Couleur	Transparent

C'est évident à travers la majorité des travaux scientifiques que la cinnamaldéhyde est le composant principal de l'HE d'écorce de cannelle. Des auteurs avaient évoqué la présence d'Eugénol (70 -95%) dans l'huile de feuille de cannelle dans leur article de synthèse. Tandis que l'huile de barre de cannelle contient du cinnamaldéhyde (65 à 80%), l'écorce de racine de cannelle contient du camphre (60%) et de l'huile de fruit se compose d'acétate de trans-cinnamyle (42-54%) ainsi que caryophyllène (9 à 14%) comme constituants importants (**Rao et al., 2014**).

Pour la citronnelle, les constituants identifiés par analyse GC-MS et leurs pourcentages de surface sont résumés dans le tableau V. L'huile était dominée par les hydrocarbures monoterpéniques qui représentaient 94,25% de l'huile. Cette fraction monoterpénique a été caractérisée par un pourcentage élevé de Citral (49,53%), néral (13,31%), myrcène (15,41%) et géraniol (3,05%). Seulement 0,78% des composants identifiés étaient des sesquiterpènes. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans d'autres plantes riches en HE (**Omidbaigi et al., 2004 ; Sefidkon et al., 2006**). Les proportions relativement plus élevées de citral-a et citral-b et de néral dans l'huile essentielle d'ombre ; les feuilles de citronnelle séchées étaient plus prononcées que celles des deux autres méthodes de séchage. Alors que la teneur en myrcène de l'huile essentielle de feuilles de citronnelle séchées au four était plus élevée que celle des huiles essentielles dans les feuilles séchées en utilisant les deux autres méthodes.

2 Hémi-synthèse des molécules à nouveau benzimidazole

Les benzimidazoles synthétisés selon le schéma de la section matériel et méthode sont susceptibles d'être une classe prometteuse de composés hétérocycliques bioactifs qui présentent une gamme très large d'activités biologiques. De nombreuses études ont montrés l'efficacité des benzimidazoles contre diverses souches de microorganismes.

Compte tenant à cette importance biologique et polyvalence thérapeutique, il est toujours utile de concevoir de nouveaux benzimidazoles et les bien caractériser, dans la perspective de développer de nouveaux candidats thérapeutiques.

3 Caractérisation RMN¹H

De façon générale, l'analyse RMN¹H des composés isolés révèle la présence d'un singlet 2H à 8.1, 7.6ppm correspondant aux deux protons pyrroliques comme l'indique les schémas ci-dessous (Schéma 36, 37 et 38). On note également la présence d'un multiplet entre 7,16 et 7,08 ppm correspondant aux 4 protons aromatiques. La structure est confirmée par le spectre de masse avec un pic de l'ion moléculaire à 100%. Aussi, on observe deux doublets dédoublés à 7,7 et 7,6 ppm attribuables aux quatre protons aromatiques.

Les caractéristiques structurales et spectrales sont indiquées dans les figures suivantes :

- **Caractérisation du 2-(1H-1,3-benzodiazol-2-yl) phenol (1b)**

¹H NMR: δ 7.12 (1H, ddd, $J = 7.7, 7.6, 1.2$ Hz), 7.23-7.33 (2H, 7.28 (ddd, $J = 8.1, 7.6, 1.6$ Hz), 7.30 (ddd, $J = 8.3, 1.2, 0.4$ Hz)), 7.41 (1H, ddd, $J = 7.7, 7.6, 1.2$ Hz), 7.54 (1H, ddd, $J = 8.3, 7.6, 1.7$ Hz), 7.72-7.78 (2H, 7.75 (ddd, $J = 7.7, 1.6, 0.5$ Hz), 7.75 (ddd, $J = 7.7, 1.7, 0.4$ Hz)), 7.93 (1H, ddd, $J = 8.1, 1.2, 0.5$ Hz).

c

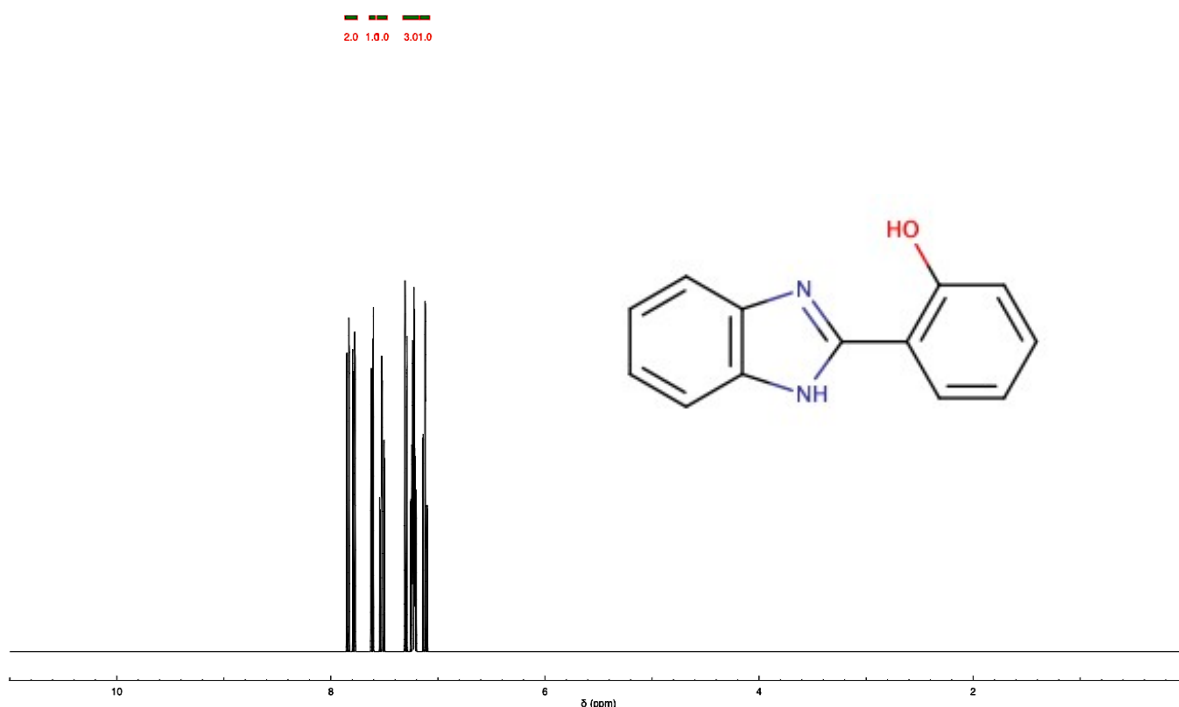


Figure 36. Structure et spectre RMN ¹H du 2-(1H-1,3-benzodiazol-2-yl) phenol (1b)

- **Caractérisation du 2-[(1E)-2-phenylethenyl]-1H-1,3-benzodiazole (2b)**

^1H NMR: δ 7.05 (1H, ddd, $J = 7.7, 7.6, 1.3$ Hz), 7.12-7.22 (2H, 7.17 (d, $J = 14.0$ Hz), 7.17 (ddd, $J = 8.1, 7.6, 1.4$ Hz)), 7.26-7.46 (6H, 7.36 (dddd, $J = 8.0, 7.6, 1.5, 1.5$ Hz), 7.42 (d, $J = 14.0$ Hz), 7.41 (dddd, $J = 8.1, 1.8, 1.5, 0.5$ Hz), 7.31 (tdd, $J = 8.0, 1.6, 0.5$ Hz)), 7.61 (1H, ddd, $J = 8.1, 1.3, 0.4$ Hz), 7.86 (1H, ddd, $J = 7.7, 1.4, 0.4$ Hz).

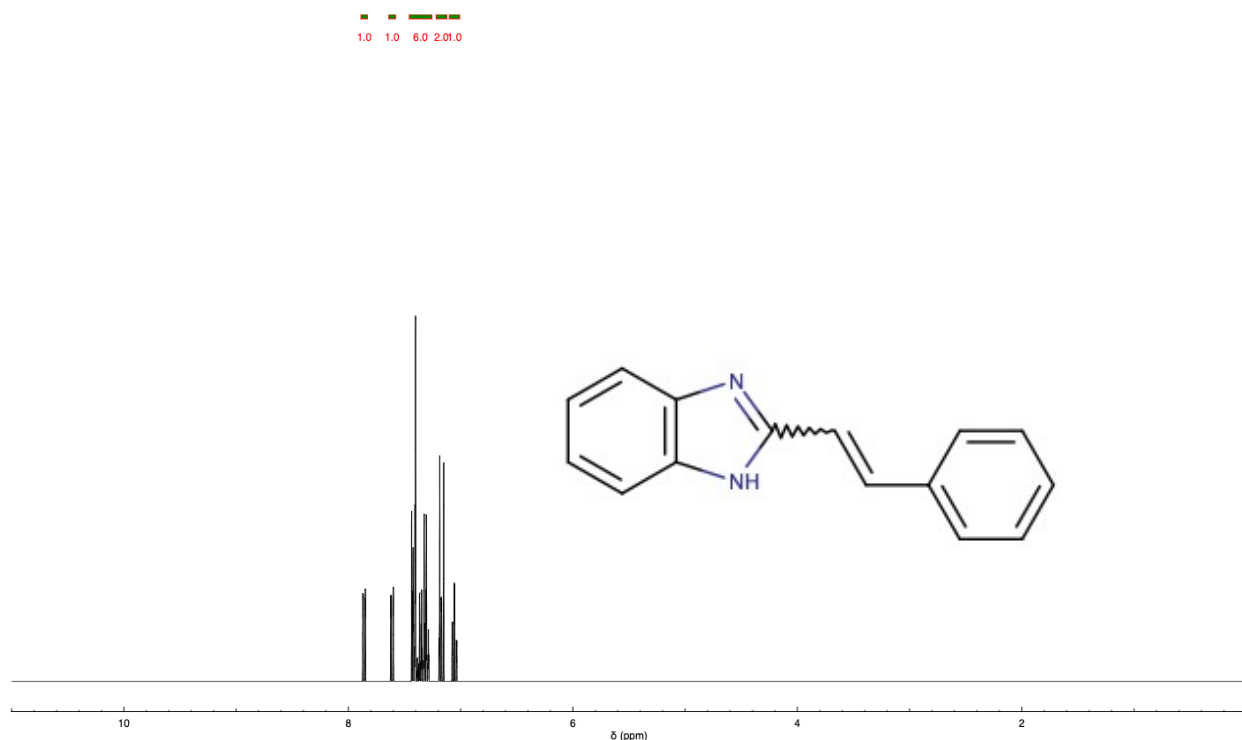


Figure 37. Structure et spectre RMN ^1H du 2-[(1E)-2-phenylethenyl]-1H-1,3 benzodiazole (2b)

- **Caractérisation du 2-[(1E)-2,6-dimethylhepta-1,5-dien-1-yl]-1H-1,3-benzodiazole (3b)**

^1H NMR: δ 1.53-1.54 (6H, 1.54 (s), 1.54 (s)), 1.76 (3H, s), 2.06-2.14 (4H, 2.12 (t, $J = 7.4$ Hz), 2.10 (td, $J = 7.4, 7.2$ Hz)), 5.26 (1H, t, $J = 7.2$ Hz), 6.43 (1H, s), 7.05 (1H, ddd, $J = 7.9, 7.6, 1.3$ Hz), 7.21 (1H, ddd, $J = 8.1, 7.6, 1.5$ Hz), 7.58 (1H, ddd, $J = 8.1, 1.3, 0.5$ Hz), 7.71 (1H, ddd, $J = 7.9, 1.5, 0.5$ Hz).

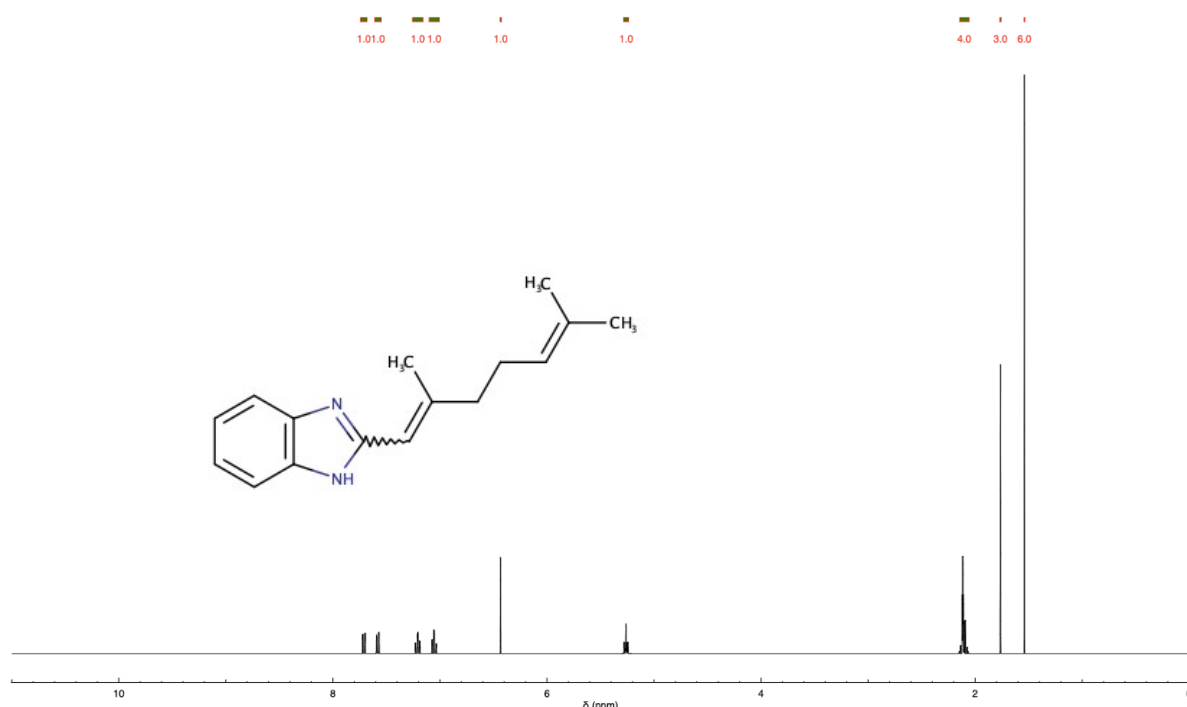


Figure 38. Structure et spectre RMN 1H du 2- [(1E)-2,6-dimethylhepta-1,5-dien-1-yl]-1H-1,3-benzodiazole (3b)

4 Résultats des activités biologiques

4.1 Activité antioxydante

Il est bien connu que les espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui peuvent être des radicaux de superoxyde, l'hydroxyle et de peroxyde, sont des causes du stress oxydant associé à la pathogénèse de diverses maladies comme l'Alzheimer, le Parkinson et les dommages d'ADN menant à la carcinogénèse (Mavrova et al., 2015). D'autre part, les antioxydants font partie du système de protection de l'organisme. Un antioxydant est une molécule qui inhibe ou ralentit la formation des ROS et empêche leur action destructive. Ces dernières années la recherche de nouvelles molécules antioxydantes a suscité un grand intérêt. De nombreuses méthodes sont utilisées pour la détermination du potentiel antioxydant des molécules.

Les composés synthétisés au cours de cette étude (1b, 2b et 3b) ont été analysés pour leur activité antioxydante à l'aide de quatre essais in vitro complémentaires : le test au (DPPH), le pouvoir réducteur du fer, l'inhibition du blanchiment du β -carotène et l'inhibition de la formation de TBARS. Les résultats sont exprimés en EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$). C'est un paramètre utilisé pour estimer l'activité antioxydante. Plus cette concentration est faible, plus l'effet antioxydant est élevé. Les trois molécules ont montré une activité antioxydante avec

différentes performances. Le composé 1b a montré la plus forte activité avec des valeurs EC₅₀ les plus faibles (53 µg/mL, pour le DPPH et 54 µg/mL pour le pouvoir réducteur), suivie de 134 µg/mL pour l'inhibition de la formation de TBARS, et 192 µg/mL pour l'inhibition du blanchiment du β-carotène. Le composé 3b a présenté les valeurs les plus élevées d'EC₅₀ variant de 102 à 220 µg/mL. Tandis que le composé 2b a donné des résultats relativement moyens (variaient de 101-183 µg/mL) (fig. 39).

Le test du DPPH est utilisé pour déterminer le pouvoir de piégeage des radicaux libres (free radical scavenging) des molécules. C'est un paramètre très important en raison du rôle délétère des radicaux libres dans les aliments et les systèmes biologiques (**Gulcin et al., 2010**). Dans le test de DPPH, les antioxydants ont pu réduire le radical stable DPPH (couleur violette) à la diphényle-picrylhydrazine de couleur jaune. La méthode est basée sur la réduction de la solution alcoolique de DPPH en présence d'un antioxydant donnant de l'hydrogène en raison de la formation de la forme non radicale de DPPH-H. le composé 1b a donné une valeur EC₅₀ la plus faible 53 µg/mL, suivi du composé 2b (139 µg/mL) et le composé 3b (220 µg/mL).

La capacité de donation d'électrons dans une réaction d'oxydoréduction peut être aussi utilisée dans la mesure de l'activité antioxydante d'un composé. Cette capacité de donation d'électrons est appelée pouvoir réducteur. Le pouvoir réducteur de fer est mesuré par spectrophotométrie et se basant sur l'efficacité des antioxydants pour réduire les ions Ferriques (Fe³⁺) en Ferreux (Fe²⁺). Les valeurs obtenues pour ce test montrent que les composés testés présentaient un fort pouvoir réducteur du fer. Le composé 1b est le plus actif avec une valeur de EC₅₀ = 54 µg/mL. Les composés 2b et 3b présentés des valeur similaires (101 et 102 µg/mL).

Le test TBARS est utilisé pour mesurer l'inhibition de la peroxydation lipidique en présence des dérivés du benzimidazole synthétisés. Ce test est basé sur la réaction de la malondialdéhyde MDA (produit secondaire de la peroxydation lipidique) avec l'acide thiobarbiturique TBA pour obtenir un complexe chromogène (TBA-MDA) avec absorption maximale à 530 nm. (**Mavrova et al., 2015**). Les résultats ont montré une activité inhibitrice de la peroxydation lipidique similaires pour les molécules 1b et 3b (EC₅₀ = 134 µg/mL) et un potentiel relativement proche pour la molécule 2b (EC₅₀ = 156 µg/mL).

L'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode du blanchiment du β-carotène est basé sur la sensibilité du β-carotène aux radicaux libres générés de l'oxydation de l'acide linoléique. Alors, ces produits de réaction déclenchent la transformation du β-carotène en sa forme incolore. Le degré de décoloration est mesuré par spectrophotométrie et utilisé comme une estimation de l'activité antioxydante. D'après les résultats obtenus, le composé 2b semble

être le meilleur inhibiteur de l'oxydation de l'acide linoléique ($EC_{50} = 181 \mu\text{g/mL}$), suivi de 1b ($191 \mu\text{g/mL}$) et 3b ($202 \mu\text{g/mL}$).

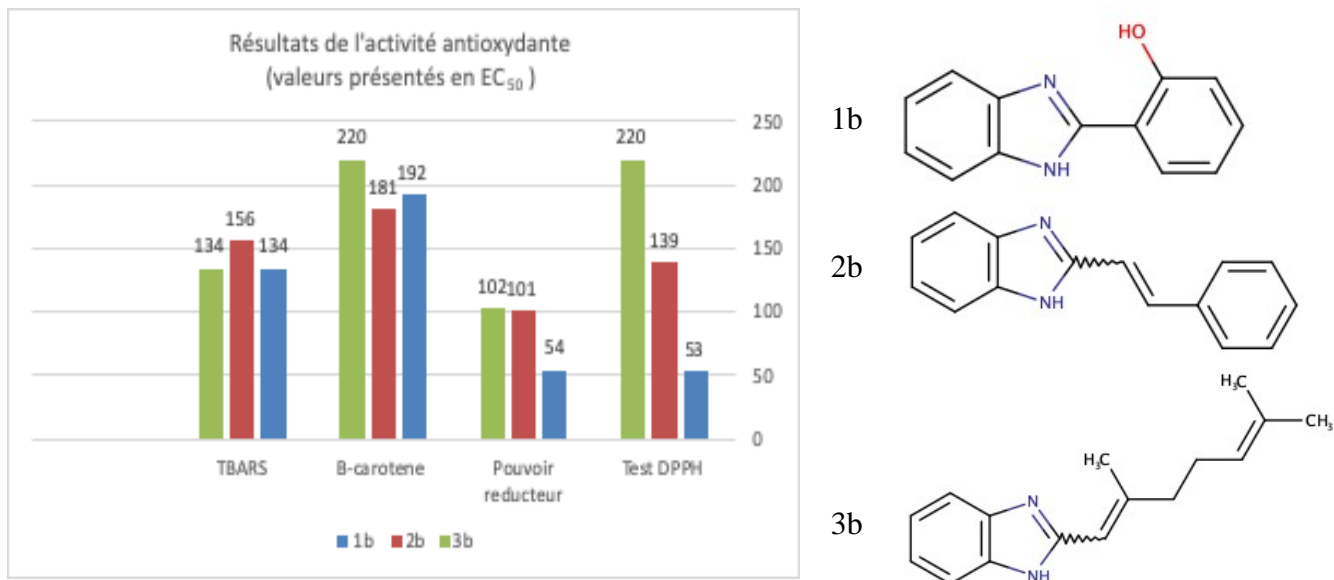


Figure 39. Résultat de l'activité antioxydante.

En comparant les résultats de l'activité antioxydante et les structures des trois composés, on constate que le benzimidazole substitué en position 2 par le phenol (le composé 1b dérivé de la salicylaldéhyde) avec un groupement hydroxyle libre possède une activité antioxydante significative, notamment un pouvoir de piégeage des radicaux libres, un pouvoir réducteur des ions de fer et une capacité inhibitrice de la peroxydation lipidique, très remarquables. Ces résultats montrent que le composé 1b était le plus performant, qui présentaient les concentrations inhibitrices les plus faible et de multiples mécanismes d'action, du cout c'est le benzimidazole le plus prometteur pour le développement d'un médicament antioxydant.

4.2 Activité antibactérienne

La recherche de composés antimicrobiens naturels en microbiologie clinique est incitée par la nécessité de contrecarrer les maladies infectieuses croissantes causées par de souches multi-résistantes aux médicaments (MDR : *Multi-Drug-Resistant* et TDR : *Totally drug-resistant*). Dans le domaine biomédical, la résistance bactérienne entraîne un besoin croissant de nouveaux matériaux anti-infectieux efficaces pour prévenir et retarder les infections associées aux implants et aux dispositifs. Dans les travaux en cours, l'activité antibactérienne des molécules de synthèse (1b-3b) a été testée contre 4 bactéries, dont certaines sont multirésistantes. Le composé 1b a montré la plus forte activité contre *S.aureus* et *C.albicans* (CMI <0.3125mg/mL), suivie de *E.coli* et *S.typhi* (CMI = 0.3125 mg/mL), et *P.aeruginosa* (CMI = 0.625 mg/mL). Le composé 2b a également donné des valeurs de CMI relativement bonnes, pour l'inhibition de *E.coli*, *S.aureus* et *S.typhi* (CMI = 0.3125 mg/mL), suivie de *C.albicans* (CMI = 0.625 mg/mL) et *P.aeruginosa* (CMI 1,5 mg/mL). Le composé 3b a donné des valeurs presque semblable avec, CMI = 0.3125 mg/ml pour l'inhibition de *E.coli*, *S.aureus*, *S.typhi* et *C.albicans*, et s'est avéré moins actif contre *P.aeruginosa* (Tableau VII). Les molécules analysées étaient moins efficaces que les antibiotiques utilisés comme témoins de référence.

Tableau V. Résultats de l'activité antibactérienne

Molécule	Molécule d'origine	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. typhi</i>	<i>C. albicans</i>
		CMI	CMI	CMI	CMI	CMI
1 b	salicylaldehyde	0.3125	<0.3125	0.625	0.3125	<0.3125
2 b	cinnamaldehyde	0.3125	0.3125	1.25	0.3125	0.625
3 b	citral	0.3125	0.3125	2.5	0.3125	0.3125
Antibiotiques	Gentamicine 10Ug	<0.078	<0.078	0.156	<0.156	nt
	Ceftazidime 30Ug	<0.156	0.156	0.156	<0.156	nt
	Nystatine	nt	nt	Nt	nt	<0.078 ^a

Ces résultats montrent que les produits synthétisés peuvent être qualifiée de bactériostatiques et fongistatiques. De même, selon la caractérisation chimique les molécule 1b présentant un groupement hydroxyle été la plus active. Cependant, ces composés peuvent servir d'antibiotiques en raison de leur capacité à se complexer avec des protéines extracellulaires solubles et à se complexer avec des parois cellulaires bactériennes, entraînant souvent leur inactivation et leur perte de fonction (**Cushnie et**

al., 2011 ; Wink, 2015). De plus, les benzimidazoles réagissent avec les macromolécules (protéine, acide nucléiques) pour modifier leur structure.

Les activités antimicrobiennes des produits contenant des groupement hydroxyles peuvent impliquer différents modes d'action, à savoir la déstabilisation et la perméabilisation de la membrane cytoplasmique et l'inhibition des enzymes par les produits oxydés, éventuellement par réaction avec des groupes sulfhydriles ou par des interactions plus non spécifiques avec les protéines (**Borges et al., 2013**).

En fait, il est probable que la première cible cellulaire des composés synthétisés est la double couche de phospholipides de la membrane bactérienne, dans laquelle certains ont la capacité de pénétrer. Lorsqu'une molécule, s'intercale dans la membrane l'espace entre les chaînes d'acides gras des phospholipides s'agrandit, la membrane est alors perméabilisée, fluidifiée et son rôle structurel est perturbé. La perméabilisation de la membrane peut entraîner des fuites d'ions tels que le potassium ou les phosphates, d'ATP, de macromolécules comme le ribose, le glutamate. Plus généralement, cette perméabilisation de la membrane peut conduire à la dissipation des gradients ioniques, dont celui de pH ce qui ferait chuter la force motrice essentielle à la synthèse de l'ATP.

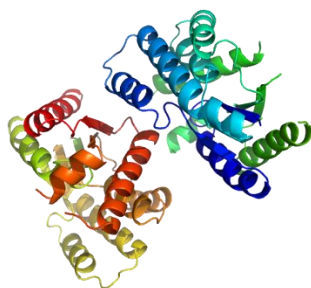
5 Les résultats du docking

Les composés **1b** et **2b**, ont été évaluées pour leur activité inhibitrice de la protéine 4QGH (*S.aureus* TMK) au moyen du logiciel du docking, AutoDOCK Tools. Les résultats sont donnés ci-dessous. Le meilleur résultat du docking est la conformation avec une faible énergie c'est-à-dire qui présente un deltaG le plus faible. Ici on voit que la technique de docking a sélectionnée 35 conformations candidates pour la molécule **1b** et 45 conformations candidates pour la molécule **2b**.

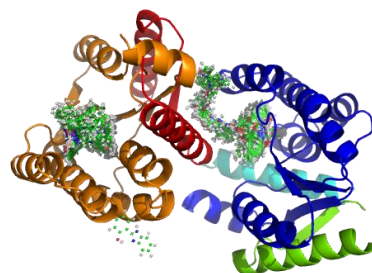
Afin de trouver la meilleure interaction résiduelle telle que Hbond (liaison hydrogène), vdw (interaction Van Der Waals) dans les sites conservés de protéines en fonction de l'énergie, de la forme physique complète. On a d'abord cerné la bonne interaction en comparant avec les substrats de structures complexes standard (ligands) aux différents résultats d'amarrage de protéines avec un même ligand. Parce qu'on général, dans l'interaction protéine-ligand, on estime l'affinité de liaison du ligand en fonction du score Dock, de l'énergie, de l'interaction résiduelle (Hbond, vdw, stérique) avec la distance (Ao).

Fondamentalement, la façon dont deltaG est calculé pour une conformation de ligand particulière est primordiale pour la probabilité la plus élevée de prédiction deltaG correcte. Si Le deltaG est plus bas pour le même ligand lié au récepteur, alors ce ligand a une probabilité plus élevée d'être un ligand réel par rapport à d'autres ligands potentiels avec des deltaG plus élevés. Cette affirmation est celle utiliser pour décrire les meilleures possibilités de positionnement des molécules synthétisées sur la protéine 4QGH.

5.1 Docking du composé **1b** :2-(1H-1,3-benzodiazol-2-yl) phenol avec la proteine4QGH



4QGH

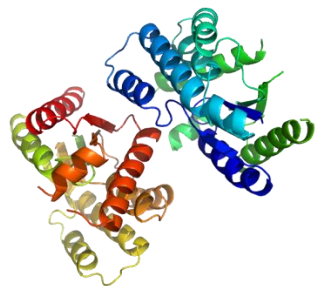


4QGH/**1b** (3 sites distincts dedocking)

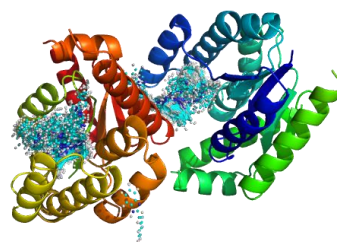
Tableau VI. Prédiction dudoking4QGH/1b montrant les valeurs des clusters et deltaG

Cluster	ClusterRank	FullFitness	SimpleFitness	Energy	deltaG
0	0	-2698.0215	4.51131	4.51131	-6.7186484
0	1	-2698.002	4.51214	4.51214	-6.7157845
0	2	-2696.4387	6.14241	6.14241	-6.254637
0	3	-2696.4248	6.13873	6.13873	-6.252206
0	4	-2696.4065	6.14785	6.14785	-6.2462754
0	5	-2694.4067	6.94071	6.94071	-6.689126
0	6	-2694.317	5.37405	5.37405	-6.4399643
0	7	-2693.1934	7.07346	7.07346	-6.058659
1	0	-2697.6125	2.48765	2.48765	-6.7176986
1	1	-2697.6118	2.48767	2.48767	-6.7176614
1	2	-2697.599	2.48827	2.48827	-6.71715
1	3	-2697.5227	2.64863	2.64863	-6.706571
1	4	-2694.3738	4.81484	4.81484	-6.1888676
1	5	-2692.2961	7.54246	7.54246	-6.653075
1	6	-2691.8108	7.57209	7.57209	-6.6087074
1	7	-2688.4355	9.13151	9.13151	-5.9126496
2	0	-2696.834	5.98681	5.98681	-6.581071
2	1	-2696.776	5.95115	5.95115	-6.5757127
2	2	-2695.0515	6.30143	6.30143	-6.1600685
2	3	-2694.8184	5.64897	5.64897	-6.4375534
2	4	-2694.5615	5.58797	5.58797	-6.4231153
2	5	-2694.5151	5.59211	5.59211	-6.4202
2	6	-2693.4907	7.35861	7.35861	-6.5754514
2	7	-2692.3325	7.02003	7.02003	-6.537052
3	0	-2695.3347	7.42517	7.42517	-6.474858
3	1	-2695.3333	7.42683	7.42683	-6.4751034
3	2	-2692.7375	8.74257	8.74257	-6.1763287
3	3	-2692.711	8.74423	8.74423	-6.176862
3	4	-2692.3474	8.86972	8.86972	-6.1520457
3	5	-2691.1296	9.81797	9.81797	-6.336691
3	6	-2691.1145	9.81536	9.81536	-6.3358965
3	7	-2690.9043	9.74165	9.74165	-6.3316045

5.2 Docking du composé **2b** :2-(1E)-2-phenylethenyl]-1H-1,3-benzodiazole avec la protein4QGH



4QGH



4QGH/**2b** (4 sites distincts de docking)

Tableau VII. Prédiction du docking 4QGH/2b montrant les valeurs des clusters et deltaG

Cluster	ClusterRank	FullFitness	SimpleFitness	Energy	deltaG
0	0	-2699.6047	5.37538	5.37538	-6.9100585
0	1	-2698.1921	6.61246	6.61246	-6.8119664
0	2	-2696.607	7.65488	7.65488	-6.6744604
0	3	-2695.9387	8.27003	8.27003	-6.6452756
0	4	-2692.7878	11.6507	11.6507	-6.4513264
0	5	-2692.0642	13.4253	13.4253	-6.4595776
0	6	-2691.684	12.9883	12.9883	-6.212192
1	0	-2699.008	6.35037	6.35037	-7.0414324
1	1	-2698.6084	4.83934	4.83934	-6.767182
1	2	-2698.5776	4.84075	4.84075	-6.760628
1	3	-2698.5225	5.03961	5.03961	-6.7724967
1	4	-2695.8801	7.61959	7.61959	-6.542833
1	5	-2695.6929	7.85391	7.85391	-6.4653044
1	6	-2695.4138	8.94096	8.94096	-6.47828
1	7	-2695.0474	8.63102	8.63102	-6.300093
1	8	-2694.8674	8.84174	8.84174	-6.244631
1	9	-2694.1465	9.00115	9.00115	-6.185612
1	10	-2693.7852	9.57298	9.57298	-6.1926594
1	11	-2693.6711	9.59072	9.59072	-6.0696387
1	12	-2693.349	9.64567	9.64567	-6.0817275
1	13	-2690.4526	13.9282	13.9282	-6.8362837
1	14	-2689.933	11.9205	11.9205	-5.67437
2	0	-2697.6726	4.45568	4.45568	-6.7730646
2	1	-2696.2173	6.27731	6.27731	-6.6488833

Résultats et discussion

2	2	-2696.149	5.45862	5.45862	-6.6048317
2	3	-2693.3994	8.61206	8.61206	-6.3498316
2	4	-2684.9373	16.4293	16.4293	-5.8467174
2	5	-2684.9058	16.2764	16.2764	-5.8008018
2	6	-2682.026	19.1566	19.1566	-5.82786
2	7	-2681.6187	19.4467	19.4467	-5.739331
2	8	-2680.755	20.3642	20.3642	-5.440697
3	0	-2697.5496	3.9867	3.9867	-6.7166886
3	1	-2697.5374	3.98572	3.98572	-6.7141867
3	2	-2697.4663	4.01547	4.01547	-6.7069454
3	3	-2697.4468	3.9878	3.9878	-6.7062016
3	4	-2695.7478	4.42789	4.42789	-6.5618997
3	5	-2692.1206	6.9857	6.9857	-5.943608
3	6	-2687.4456	7.99564	7.99564	-5.975361
4	0	-2697.2717	3.33869	3.33869	-7.196138
4	1	-2697.2295	3.33185	3.33185	-7.189074
4	2	-2697.2283	3.33256	3.33256	-7.1882653
4	3	-2697.219	3.3321	3.3321	-7.1886954
4	4	-2697.1418	3.33628	3.33628	-7.1815286

Conclusion

Conclusion

Conclusion

Le présent travail de thèse en pharmacochimie s'inscrit dans le cadre de la recherche de nouvelles molécules d'intérêt thérapeutique. Pour ce faire, on a conçu suivant le concept d'hybridation moléculaire, trois molécules dérivées du benzimidazole à profils synthétique et hémi-synthétique, par réaction de l'OPA avec divers aldéhydes (salicylaldéhyde, cinnamaldéhyde et citral), et évaluées leurs activités antioxydantes et antimicrobiennes par divers test in-vitro. Le benzimidazole substitué en position 2 par le phenol (le composé 1b dérivé de la salicylaldéhyde) avec un groupement hydroxyle libre possède une activité antioxydante significative, notamment un pouvoir de piégeage des radicaux libres, un pouvoir réducteur des ions de fer et une capacité inhibitrice de la peroxydation lipidique, très remarquables. Pour le test de l'activité antimicrobien, la bactérie Gram positive *S. aureus* et la levure *C. albicans* étaient plus sensibles, que les bactéries Gram-négatives exposés à des concentrations variables des molécules testées. On avait observé que le dérivé 1b a montré la plus forte activité antibactérienne contre les souches étudiées avec des CMI très faibles variant de. De plus, les molécules testées sont avérées moins actives contre *P. aeruginosa*.

L'amarrage moléculaire a été effectué par la suite à l'aide du logiciel AutoDock sur la protéine thymidylate kinase TMK de *S. aureus* pour mettre en évidence la relation structure-activité des molécules 1b et 2b et qui se sont révélés être de puissants inhibiteurs de TMK.

Avec le développement des outils informatiques, les techniques de recherche *in silico* sont très vite introduits dans le domaine de la recherche en biologie, ils ont eu un impact fondamental dans la compréhension des différents mécanismes biologiques à l'échelle moléculaire. Entre autres, les techniques de modélisation moléculaire par docking peuvent être d'un important soutien à l'identification de nouvelles molécules a visée thérapeutique. En raison de sa valeur biologique et pharmaceutique, on s'est efforcé d'améliorer les méthodes qui calculent l'amarrage moléculaire.

Au plan biologique, il sera question :

- ♣ De réaliser le criblage pharmacologique notamment anti-infectieux des molécules synthétisées ;
- ♣ D'évaluer également la cytotoxicité des meilleures benzimidazoles bioactives.

Conclusion

Annexes

Annexe 1

Tableau. Liste du matériel de laboratoire.

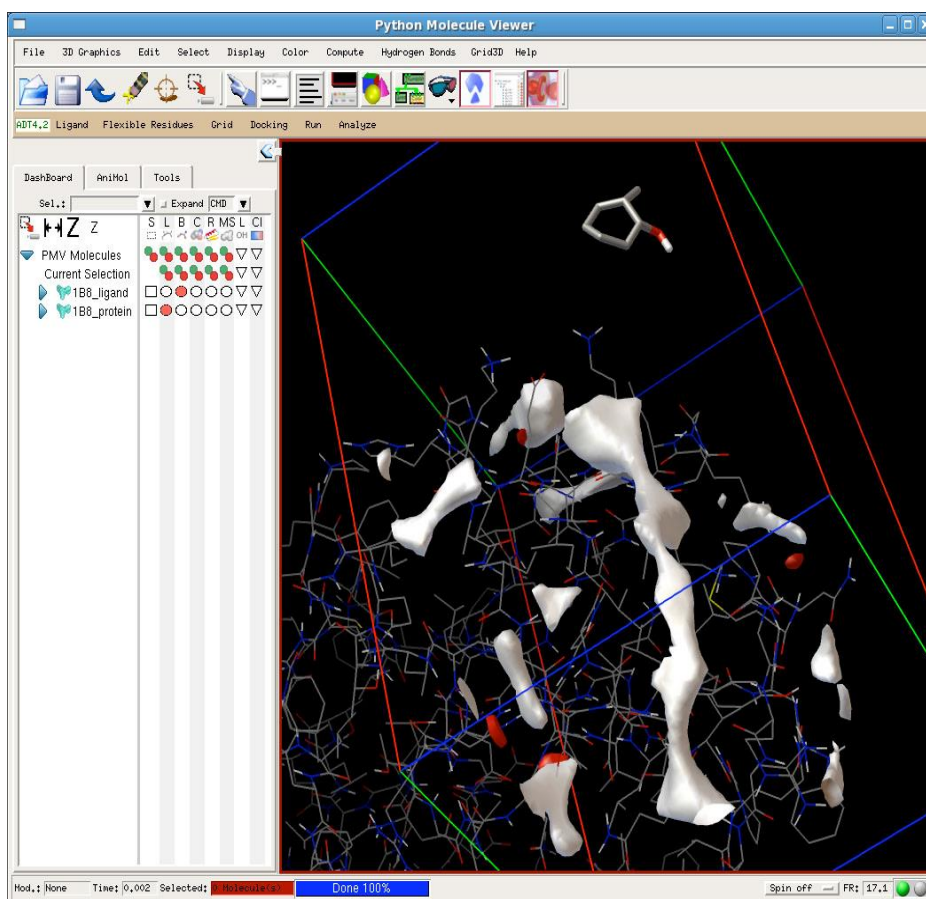
Equipements	Verrerie	Autre matériel
Rotavap	Ballons à fond rond	Silice
Centrifugeuse	Ballons à fond plat	Sable et coton,
Micro-onde	Béchers,	Support et tubes à essai,
Lecteur optique UV-Vis	Entonnoir,	Laine verte
Thermostat type Wisecircu® WCR - P 8 DHWCR00208.	Pipettes pasteur, Verre à pied,	Propipettes, Barreaux magnétiques
Lecteur de microplaque ELX800 (Bio-Tek)	Colonne en verre	Microplaques 96
Spectrophotomètre Analytik Jena	Tubes RMN	Microplaques 48
Vortex	Tubes à essais	
Spectroscope RMN 400MHz Bruker		
Etuve (Jouan, Berlin, Allemagne)		

Annexes

Annexe 2.

La fenêtre Autodock Tools comporte plusieurs parties :

- 1) En haut, on trouve des menus qui donne accès aux méthodes générales disponible dans le lire et écrire des coordonnées et des images, pour modifier des coordonnées, pour la sélection et pour la visualisation.
- 2) Une rangée de boutons en haut permet un accès rapide aux outils les plus populaires de PMV.
- 3) Sous les boutons, il y a une série de menus qui accèdent aux outils AutoDock spécifique d'AutoDock Tools.
- 4) La visionneuse moléculaire 3D est au centre droit.
- 5) Le tableau de bord, situé à gauche du visualiseur, permet une sélection rapide, une visualisation coloriage des molécules actuellement affichées dans le visualiseur.



Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Adnan M., Ali S., Sheikh K., et Amber R., 2019. Review on antibacterial activity of Himalayan medicinal plants traditionally used to treat pneumonia and tuberculosis. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol.71, p.1599–1625.
- Alasmary F., Snelling A., Zain M., Alafeefy A., Awaad A., et Karodia, N. 2015. Synthesis and Evaluation of Selected Benzimidazole Derivatives as Potential Antimicrobial Agents. *Molecules*, vol.20(8), p.15206–15223.
- Awasthi, D., Kumar, K., et Ojima, I. 2011. Therapeutic potential of FtsZ inhibition: a patent perspective. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, vol.21(5), p.657–679.
- Balasundram N., Sundram K. et Samman S., 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, vol.99(1), p.191–203.
- Beautrait A., 2008. Développement et validation de la plateforme de criblage virtuel VSM-GET et du domaine FAT de la kinase d'adhérence FOCAL FAK. Université Henri Poincaré – Nancy I. Thèse de doctorat, 217pages, pp.40, 41, 42, 47, 49.
- Benhammou N., 2011. Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien. Université Aboubakr Belkaïd-Tlemcen. Thèse de doctorat. 161 pages, pp. 8.
- Benhammou N., AtikBekkaraF., et Panovska T.K., 2009. Antioxidant activity of methanolic extracts and some bioactive compounds of *Atriplex halimus*. *C. R. Chimie*, vol.12, p.1259–1266.
- Berger Mette M., 2006. Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances Nutritional manipulation of oxidative stress : review of the evidence. *Nutrition clinique et métabolisme*, vol.20, pp.48–53.
- Beta T., Nam S., Dexter J.E., et Sapirstein H.D., 2005. Phenolics content and antioxidant activity of pearled wheat and Roller-Milled fractions. *Cereal chem.*, vol.82, p. 390-393.
- Blum F., 2014. High performance liquid chromatography. *British Journal of Hospital Medicine*, vol.75(Sup2), C18–C21.

Références bibliographiques

- Bodede O., Shaik S., Chenia H., Singh P., et Moodley R., 2018. Quorum sensing inhibitory potential and in silico molecular docking of flavonoids and novel terpenoids from *Senegalia nigrescens*. *Journal of Ethnopharmacology*, vol.216, p.134–146.
- Brand-Williams W., Cuvelier M. E., et Berset C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, vol.28(1), p.25–30.
- Bui Van Hoi, 2013. Contribution à l'étude de la présence et du devenir des résidus pharmaceutiques dans les compartiments aquatiques. Thèse de doctorat. University of Science and Technology of Ha Noi. 165 pages. Pp.47.
- Boucherit H., Chikhi A., Bensegueni A., Merzougi A., Hiuola K. S., et Mokrani ELH., 2013. L'amarrage moléculaire ; une nouvelle approche pour lutter contre le développement de la tuberculose. *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn*, vol 7, p. 133-149.
- Boudehenn Joanne et Gambier François, 2011. Influence des finitions poudres sur l'impact environnemental du MDF. Thèse doctorat. 58 pages. Pp. 32
- Bousbia Nabil, 2011. Extraction des huiles essentielles riches en anti-oxydants à partir de produits naturels et de co-produits agroalimentaires. Ecole Nationale Supérieure Agronomique (Ex – INA El Harrach – Alger) ; Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse. 128 pages, pp. 12.
- Brooijmans N., et Kuntz I. D., 2003. Molecular recognition and docking algorithms. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, vol. 32(1), p. 335–373.
- Bryskier, A., 2006. Relation activité-structure des agents antibactériens. *Antibiotiques*, vol.8(3), p.136–146.
- Cevik U. A., Saglik B. N., Ozkay Y., Canturk Z., Bueno J., Demirci F., et Koparal A. S., 2017. Synthesis of New Fluoro-Benzimidazole Derivatives as an Approach towards the Discovery of Novel Intestinal Antiseptic Drug Candidates. *Current Pharmaceutical Design*, vol.23(15), p. 2276-2286.
- Chebrouk Farid, Madani Khodir, Cherfaoui Brahim, Boukenna Leila, Válega Mónica, Mendes Ricardo F., Paz Filipe A. A., Bachari Khaldoun, Talhi Oualid et Silva Artur M. S., 2019. Hemi-Synthesis of Chiral Imine, Benzimidazole and Benzodiazepines from Essential Oil of *Ammodaucus leucotrichus* subsp. *Leucotrichus*. *Molecules*, vol. 24, pp.1-10.
- Couic-Marinier F., 2018. Les huiles essentielles en pratique, administration et précautions d'emploi. *Actualités Pharmaceutiques*, vol.57(580), p. 26–29.

Références bibliographiques

- Couic-Marinier F., et Lobstein A., 2013. Composition chimique des huiles essentielles. *Actualités Pharmaceutiques*, vol.52(525), p. 22–25.
- Cristina Popovici, Ilonka Saykova et Bartek Tylkowski, 2009. Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel*, vol.4, p.25-39.
- Da Silva P. P. J., et Meijer L., 2012. Recherche de substances naturelles à activité thérapeutique. *Médecine/sciences*, vol. 28(5), pp. 534–542.
- De la Parra J., et Quave C. L., 2017. Ethnophyto technology: Harnessing the Power of Ethnobotany with Biotechnology. *Trends in Biotechnology*, vol.35(9), 802–806.
- Delcambre Adéline, 2010. Une approche moléculaire de l'astringence des vins : utilisation de sondes pour l'étude des interactions entre protéines de la salive et polyphénols. Université Bordeaux I, Ecole doctorale des sciences chimiques. Thèse de doctorat, 177 pages, pp. 29.
- Drouet Anne, 2015. Validation d'une méthode de recherche de traces de solvants résiduels par chromatographie en phase gazeuse couplée à l'espace de tête. Université de Nantes. Thèse de doctorat. 98 pages, pp. 22-55
- Ebenezer King Solomon, Manivannan Rekha, Punniyamoorthy Abarna et Tamilselvan Chidambaram, 2002. Plant Secondary Metabolites of Antiviral Properties a Rich Medicinal Source for Drug Discovery: A Mini Review. *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*, vol. 9(5): p.161-167.
- Ejaz Ahmed, Arshad Muhammad, Muhammad Zakriyya Khan, Muhammad Shoaib Amjad, Huma Mehreen Sadaf, Iqra Riaz, Sidra Sabir, Nabila Ahmad et Sabaoon, 2017. Secondary metabolites and their multidimensional prospective in plant life. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, vol.6(2): p.205-214.
- Eisner T., et Meinwald J., 1995. Chemical ecology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 92, p.1.
- Elkaim Judith, 2011. Drug design in silico criblage virtuel de protéines a visée thérapeutique. Université de Bordeaux I. Thèse de doctorat, 251pages, pp. 20, 22.
- El Haïb Abderrahim, 2011. Valorisation de terpènes naturels issus de plantes marocaines par transformations catalytiques. Université de Toulouse. Thèse de doctorat, 157 pages, pp. 9.

Références bibliographiques

EL-Sayed T., Aboelnaga A., et Hagar M., 2016. Ball Milling Assisted Solvent and Catalyst Free Synthesis of Benzimidazoles and Their Derivatives. *Molecules*, vol.21(9), 1111.

Estrada-Soto S., Villalobos-Molina R., Aguirre-Crespo F., Vergara-Galicia J., Moreno-Díaz H., Torres-Piedra M., et Navarrete-Vázquez G., 2006. Relaxant activity of 2-(substituted phenyl)-1H-benzimidazoles on isolated rat aortic rings. *Life Sciences*, vol.79(5), p.430–435.

Fabre Nicolas, 2017. Conseil et utilisation des huiles essentielles les plus courantes en officine. Université Paul Sabatier III. Toulouse. Thèse de doctorat, 213 pages.

Falcão Lina et Araújo Maria Eduarda M., 2018. Vegetable tannins used in the manufacture of historic leathers. *Molecules*, vol. 23(5), 1081., p.1-20.

Faye Loïc et Champey Yves, 2008. Plantes, médicaments et génétique : Quelles applications pour demain ? *Médecine/science*, vol.24, p.939–946.

Fleuriet Annie, Uhel Christiane et Dédaldéchamp Fabienne, 1996. Les composés phénoliques et la qualité des produits d'origine végétale consommés par l'homme, *Acta Botanica Gallica*, vol.143 :6, p.493-500.

Férey N, Bouyer G, Martin C, Drif A, Bourdot P, Ammi M, Nelson J, Burkhart J-M, et Autin L.,2008. Docking de protéines en réalité virtuelle : une approche hybride et multimodale. 2e soumission à Rsti, p. 1-32.

Gobis K., Foks H., Serocki M., Augustynowicz-Kopeć E., et Napiórkowska A., 2015. Synthesis and evaluation of in vitro antimycobacterial activity of novel 1H-benzo[d]imidazole derivatives and analogues. *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol.89, p.13–20.

Grosdidier Aurélien, 2007. Conception d'un logiciel de docking et applications dans la recherche de nouvelles molécules actives. Université Joseph Fourier, faculté de pharmacie de Grenoble. Thèse de doctorat, 90 pages, pp. 13, 16, 17.

Gudmundsson Kristjan S., Sebahar Paul R., Richardson Leah D'Aurora, Miller John F., Turner Elizabeth M., Catalano John G., Spaltenstein Andrew, Lawrence Wendell, Thomson Michael et Jenkinson Stephen, 2009. Amine substituted N-(1H-benzimidazol-2-ylmethyl)-5,6,7,8-tetrahydro-8-quinolinamines as CXCR4 antagonists with potent activity against HIV-1. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, vol.19(17), p.5048–5052.

Guerriaud M., 2018. Réglementation des huiles essentielles, un besoin de sécurité. *Actualités Pharmaceutiques*, vol.57(580), p. 21–25.

Références bibliographiques

Guillemain Hélène, 2012. Evaluation et application de méthodes de criblage *in silico*. ÉCOLE DOCTORALE ARTS ET METIERS, Génomique, Bioinformatique et applications. Thèse de doctorat, 134 pages, pp.34.

Guimarães R., Barros L., Calheta R. C., Carvalho A. M., Queiroz, M. J. R. P., et Ferreira I. C. F. R. 2014. Bioactivity of different enriched phenolic extracts of wild fruits from Northeastern Portugal: a comparative study. *Plant Foods Human Nutrition*, vol.69, p.37–42.

Gulcin Ilhami, Huyut Zubeyr, Elmastas Mahfuz et Aboul-Enein Hassan Y., 2010. Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian Journal of Chemistry*, vol.3, p.43–53.

Hadri Ghembaza Nassira, 2015. Etude phytochimique et activité antioxydante d'extraits de plantes *Sedum villosum* L. (Orpin.) et *Anabasis articulata* Moq (Forsk.). Université Abou Bekr Belkaid, Telemcen, Algérie. Thèse de doctorat. 106 pages, pp. 24,25.

Hatano T., Kagawa H., Yasuhara T., 1988. Okuda T. Two new flavonoids and other constituents in licore root: their relative astringency and radical scavenging affects. *Chem. Pharm. Bull.* vol. 36, p.1090-2097.

Hazan Corinne, 2008. Recherche d'inhibiteurs de haute affinité de l'ADN polymérase beta par criblage virtuel et RMN. Université Toulouse III - Paul Sabatier. Thèse de doctorat, 250 pages, pp. 53.

HerziNejia, 2013. Extraction et purification de substances naturelles : comparaison de l'extraction au CO₂-supercritique et des techniques conventionnelles. Université de Toulouse France. Thèse de doctorat. 185 pages, pp. 13, 15, 17, 18.

Holloway Georgina A., Baell Jonathan B., Fairlamb Alan H., NovelloPatrizia M., Parisot John P., Richardson John, Watson Keith G., et Street Ian P., 2007. Discovery of 2-iminobenzimidazoles as a new class of trypanothione reductase inhibitor by high-throughput screening. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, vol.17(5), p.1422–1427.

Hounscome N., Hounscome B., Tomos D., et Edwards-Jones G., 2008. Plant metabolites and nutritional quality of vegetables. *Journal Of Food Science*, vol. 73(4), p.48-65.

Hranjec M., Starčević K., Pavelić S. K., Lučin P., Pavelić K., et Karminski Zamola G., 2011. Synthesis, spectroscopic characterization and antiproliferative evaluation in vitro of novel Schiff bases related to benzimidazoles. *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol.46(6), p.2274–2279.

Kalili, K. M., et de Villiers, A., 2011. *Recent developments in the HPLC separation of phenolic compounds*. *Journal of Separation Science*, vol.34(8), p.854–876.

Références bibliographiques

Kanwal Afshan, Ahmad Matloob, Aslam Sana, Naqvi Syed Ali Raza et Saif Muhammad Jawwad, 2019. Molecular-biological problems of drug design and mechanism of drug action recent advances in antiviral benzimidazole derivatives: a mini review. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, vol. 53, No. 3, p. 179-187.

Keating Thomas A., Newman Joseph V., Olivier Nelson B., Otterson Linda G., Andrews Beth, Boriack-Sjodin P. Ann, Breen John N., Doig Peter, Dumas Jacques, Gangl Eric, Green Oluyinka M., GulerSatenig Y., Hentemann Martin F., JosephMcCarthy Diane, Kawatkar Sameer, Kutschke Amy, T. Loch James, McKenzie Andrew R., Pradeepan Selvi, Prasad Swati, Martínez-Botellaa Gabriel, In Vivo Validation of Thymidylate Kinase (TMK) with a Rationally-Designed, 2012. Selective Antibacterial Compound. *ACS Chemical Biology*, vol.7(11), p.1866–1872.

Knudson Susan E., Awasthi Divya, Kumar Kunal, Carreau Alexandra, Goullieux Laurent, Lagrange Sophie, Vermet Hélène, Ojima Iwao et Slayden Richard A., 2015. Cell division inhibitors with efficacy equivalent to isoniazid in the acute murine *Mycobacterium tuberculosis* infection model. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol.70(11), p.3070–3073.

Lagarde Nathalie, 2014. Méthodes de criblage virtuel in silico : importance de l'évaluation et application à la recherche de nouveaux inhibiteurs de l'interleukine 6. École doctorale Abbé Grégoire, laboratoire génomique, bioinformatique et applications. Thèse de doctorat, 313pages, pp.124.

Lardry J-M., et Haberkorn V., 2007. L'aromathérapie et les huiles essentielles. *Kinésithérapie, La Revue*, vol.7(61), p.14–17.

Laurain-Mattar, D., et Couic-Marinier, F., 2019. Huile essentielle d'Arbre à thé ou de Tea tree. *Actualités Pharmaceutiques*, vol.58(583), p.59–61.

Legrand Guillaume, 2015. Contribution à la caractérisation du métabolisme des acides chlorogéniques chewchicorée : approche biochimique et moléculaire. Université de Lille 1. Thèse de doctorat. 348 pages, pp. 57-58.

Le Roux De Muriel et Guéritte Françoise, 2017. La Navelbine® et le Taxotère®: Histoires de sciences. Ed. ISTE Editions Ltd. 222 pages, pp. 18-132.

Lévesque H., et Lafont O., 2000. L'aspirine à travers les siècles : Rappel historique. *La Revue de Médecine Interne*, vol. 21, pp. 8–17.

Lévy-Leblond Jean-Marc, 2017. Qu'est donc le spin?. Pour la Science - n° 473 - Mars 2017.

Références bibliographiques

Macheix Jean-Jacques, Fleuriet Annie, Jay-Allemand Christian, 2005. Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importances économiques. Ed. Presses polytechniques et universitaires romandes. 192pages, p. 7-8-12.

Magnard Jean-Louis, RocchiaAymeric, Caissard Jean-Claude, Vergne Philippe, Sun Pulu, Hecquet Romain, Dubois Annick, Oyant Laurence Hibrand-Saint, Jullien Frédéric, Nicolè Florence, Raymond Olivier, Huguet Stéphanie, Baltenweck Raymonde, Meyer Sophie, Claudel Patricia, Jeauffre Julien, Rohmer Michel, Foucher Fabrice, Huguency Philippe, Bendahmane Mohammed et Baudino Sylvie, 2015. Biosynthesis of monoterpene scent compounds in roses. *Science*, vol.349(6243), p.81–83.

Mamadou Balde, 2018. Etude physico-chimique et valorisation de composés bioactifs de *Parinarima crophylla* Sabine (Chrysobalanaceae). Université de Strasbourg. Thèse de doctorat. 168 pages.

Marinach-Patrice C., Pionneau C., et Mazier D., 2011. Spectrométrie de masse en biologie médicale : principes et applications. *Bio Tribune Magazine*, vol.40(1), p.4–12.

Mavrova Anelia Ts., Yancheva Denitsa, Anastassova Neda, Anichina Kamelya, Zvezdanovic Jelena, Djordjevic Aleksandra, Markovic Dejan et Smelcerovic Andrija, 2015. Synthesis, electronic properties, antioxidant and antibacterial activity of some new benzimidazoles. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, vol.23, p.6317–6326.

Martz François, 2014. Développement d'une nouvelle méthode de docking basée sur les mécanismes enzymatiques et guidée par des groupes prosthétiques. Université Paris Sud. Thèse De Doctorat, 247 pages, pp.32.

Mayoka G., 2018. Synthesis, pharmacological and physicochemical profiling of antimalarial and antischistosomal N-aryl 3-trifluoromethyl pyrido [1,2- α] benzimidazoles. University of Cape Town. Thèse de doctorat. 341 pages.

Menet M.-C., 2011. Principes de la spectrométrie de masse. *Revue Francophone Des Laboratoires*, vol.2011(437), p.41–53.

Merghni A., Marzouki H., Hentati H., Aouni M., et Mastouri M., 2016. Antibacterial and antibiofilm activities of *Laurus nobilis* L. essential oil against *Staphylococcus aureus* strains associated with oral infections. *Current Research in Translational Medicine*, vol.64(1), p.29–34.

Mispelter Joël, 2007. Principes de la détermination de la structure tridimensionnelle de protéines en solution par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN). Institut Curie, INSERM. p1-30.

Références bibliographiques

Mnayer D., Fabiano-Tixier A-S., et Hamieh T., 2014. Eco-Extraction des huiles essentielles et des arômes alimentaires en vue d'une application comme agents antioxydants et antimicrobiens. Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse. Thèse de doctorat, 142 pages, pp. 5.

Molou KY G., Ouattara M., Sissouma D., Adjou A., Touré A S., Yapi A. D., et Ouattara L., 2010. Synthèse de 2-hétéroarylbenzimidazoles à visée anti-infectieuse par application de la réaction de Phillips. *J. sci. pharm. biol.*, Vol.11, n°2 - 2010, p.40-51.

Muther Laëtitia, 2015. Utilisation des huiles essentielles chez l'enfant. Université Auvergne. Thèse doctorat. 180 pages.

Omidbaigi R., Sefidkon F., et Kazemi, F. 2004. Influence of drying methods on the essential oil content and composition of Roman chamomile. *Flavour and Fragrance Journal*, vol.19(3), p.196–198.

Omwenga E. O., Hensel A., Pereira S., Shitandi A. A., et Goycoolea, F. M., 2017. Anti-quorum sensing, antibiofilm formation and cytotoxicity activity of commonly used medicinal plants by inhabitants of Borabusub-county, Nyamira County, Kenya. *PLOS ONE*, vol12(11), p.1-19.

Onem Ebru, Dundar Yasemin, Ulusoy Seyhan, Noyanalpan Ningur et Bosgelmez-Tinaz Gulgun, 2018. Anti-quorum sensing activity of 1, 3-dihydro-2hbenzimidazol-2-one derivatives. *Fresenius Environmental Bulletin*, vol.27, p.9906-9912.

Özkay Y., Tunalı Y., Karaca H., et Işıkdag İ. 2010. Antimicrobial activity and a SAR study of some novel benzimidazole derivatives bearing hydrazine moiety. *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol.45(8), p.3293–3298.

Paris R., et Delaveau P., 1965. Possibilités et limites de la chimiotaxonomie. *Bultin de la Société Botanique de France*, vol.112 :sup1, p.143-149.

Paul I., 2001. Encyclopédie des plantes médicinales. Larousse. 2^{ème} édition. Londres.

Palomares-Alonso Francisca, Jung-Cook Helgi, Pe´rez-Villanueva Jaime, Piliado Juan Carlos, Rodri´guez-Morales Sergio, Palencia-Herna´ndez Guadalupe, Lo´pez-Balbiaux Nayeli, Herna´ndez-Campos Alicia, Castillo Rafael et Herna´ndez-Luis Francisco, 2009. Synthesis and in vitro cysticidal activity of new benzimidazole derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol.44(4), p. 1794–1800.

Rahman I.U., Afzal A., Iqbal Z., Ijaz F., Ali N., Shah M., et Bussmann R.W., 2018. Historical perspectives of Ethnobotany. *Clinics in Dermatology*.

Références bibliographiques

Ralambondrainy M., 2017. Caractérisation chimique et biologique de trois huiles essentielles répulsives issues de la biodiversité régionale contre l'alphavirus Ross River. Thèse doctorat. Université de La Réunion. 138 page.Pp.44-45.

Rao P. V., et Gan S. H. 2014. Cinnamon: A Multifaceted Medicinal Plant. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, p.1–12.

Ribeiro da Cunha Bernardo, Fonseca Luís P., et Calado Cecília R. C., 2019. Antibiotic Discovery: Where Have We Come from, Where Do We Go? *Antibiotics*, vol. 8, pp. 1-21.

Saber Asmaa, Sebbar Nada Kheira et Essassi El Mokhtar, 2019. Synthèse, réactivité et activités biologiques des dérivés du benzimidazoles : Synthesis, reactivities and biological properties of benzimidazole derivatives. *J. Mar. Chim. Heterocycl.*, vol. 18, p.1-50.

Sambanthamoorthy Karthik, Gokhale Ankush A., Lao Weiwei, Parashar Vijay, Neiditch Matthew B., Semmelhack Martin F., Lee Ilsoon, et Waters Christopher M., 2011. Identification of a Novel Benzimidazole That Inhibits Bacterial Biofilm Formation in a Broad-Spectrum Manner. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol.55(9), p. 4369–4378.

Santhakumar Abishek B., Battino Maurizio et Alvarez-Suarez José M., 2018. Dietary polyphenols: Structures, bioavailability and protective effects against atherosclerosis. *Food and Chemical Toxicology*, vol.113, p49–65.

Sangeeta G. P. V., Purna Nagasree K., Risy Namratha J., et Krishna Kumar M. M. (2018). Synthesis, screening and docking analysis of novel benzimidazolium compounds as potent anti-microbial agents targeting FtsZ protein. *Microbial Pathogenesis*.

Sawant R., et Kawade D., 2011.Synthesis and biological evaluation of some novel 2-phenyl benzimidazole-1-acetamide derivatives as potential anthelmintic agents. *Acta Pharm*, vol.61, p.353–361.

Seaforth, C. Tikasingh, T., Gupta, M., St Rose, G., 2008. A study for the development of a handbook of selected Caribbean herbs for industry.

Senanayake, U. M., Lee, T. H. et Wills, R. B. H., 1978. Volatile constituents of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol.26(4), 822–824.

Senhaji O., Faid M., Elyachioui M., et Dehhaoui M., 2005. Étude de l'activité antifongique de divers extraits de cannelle. *Journal de Mycologie Médicale*, vol.15(4), p.220–229.

Références bibliographiques

Sefidkon F., Abbasi K., Khaniki G. B. 2006. Influence of drying and extraction methods on yield and chemical composition of the essential oil of *Satureja hortensis*. *Food Chemistry*, vol.99(1), p.19–23.

Shah, G., Shri, R., Panchal, V., Sharma, N., Singh, B., Mann, A.S., 2011. Scientific basis for the therapeutic use of *Cymbopogon citratus*, stapf (Lemon grass). *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* 2, 3–8.

Sharara A. I., 2005. Rabeprazole: the role of proton pump inhibitors in *Helicobacter pylori* eradication. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, vol.3(6), p.863-870.

Shi Yanpeng, Jiang Kai, Zheng Ran, Fu Jiayu, Yan Liuqing, Gu Qiang, Zhang Yuminet Lin Feng, 2018. Design, microwave-assisted synthesis and in vitro antibacterial and antifungal activity of 2,5-disubstituted benzimidazole. *Chemistry & Biodiversity*.

Soklou Kossi Efourako, 2016. Les dérivés du benzimidazole, un intérêt croissant en chimie thérapeutique : perspectives d'avenir. Université Mohammed V- Rabat. Thèse de doctorat. 118 pages, pp. 1,3,10,11.

Taha Muhammad, Ismail Nor Hadiani, Imran Syahrul, SelvarajManikandan, Rashwan Hesham, FarhanahFatinUmami, Rahim Fazal, Kesavanarayanan Krishnan Selvarajan et Ali Muhammad, 2015. Synthesis of benzimidazole derivatives as potent β -glucuronidase inhibitors. *Bioorganic Chemistry*, vol.61, p.36–44.

Tabart J., Kevers C., Pincemail J., Defraigne J.O. and Dommesa J., 2009. Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chemistry*, vol.113, p.1226-1233.

Taylor R. D., Jewsbury P. J., et Essex J. W. ,2002. A review of protein-small molecule docking methods. *J. Comput. Aided Mol. Des*, vol. 16, p. 151–166.

Tharmalingam N., Khader R., Fuchs B. B., et Mylonakis, E., 2019. The Anti-virulence Efficacy of 4-(1,3-dimethyl-2,3-dihydro-1h-benzimidazol-2-yl)phenol against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Microbiology*, vol.10(1557), 12 pages.

Tomei Licia, Altamura Sergio, Bartholomew Linda, Biroccio Antonino, Ceccacci Alessandra, Pacini Laura, Narjes Frank, Gennari Nadia, Bisbocci Monica, Incitti Ilario, Orsatti Laura, Harper Steven, Stansfield Ian, Rowley Michael, De Francesco Raffaele, et Migliaccio Giovanni, 2003. Mechanism of action and antiviral activity of benzimidazole-based allosteric inhibitors of the hepatitis C Virus RNA-dependent RNA polymerase. *Journal of Virology*, vol.77(24), p.13225–13231.

Tonelli Michele, Gabriele Elena, Piazza Francesca, Basilico Nicoletta, Parapini Silvia, Tasso Bruno, Loddo Roberta, Sparatore Fabio et Anna Sparatore, 2007. Benzimidazole derivatives endowed with

Références bibliographiques

potent antileishmanial activity. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, vol.33(1), p.210–226.

Urquiga I., et Leighton F., 2000. Plant polyphenols antioxidants and oxidative stress. *Biological Research*, vol.33(2), p.55–64.

Wang Y.-T., Shi T.-Q., Fu J., et Zhu, H.-L., 2019. Discovery of novel bacterial FabH inhibitors (Pyrazol-Benzimidazole amide derivatives): Design, synthesis, bioassay, molecular docking and crystal structure determination. *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol.171, p.209-220.

Wright JB., 1951. The chemistry of the benzimidazoles. *Chem Rev*, vol.48(3), p.397–541.

Wright P. M., Seiple I. B., et Myers A. G., 2014. The Evolving Role of Chemical Synthesis in Antibacterial Drug Discovery. *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 53(34), pp. 8840–8869.

Yadav G., et Ganguly S., 2015. Structure activity relationship (SAR) study of benzimidazole scaffold for different biological activities: A mini-review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol.97, p.419–443.

Zakkad Farida, 2017. Etude phytochimique et évaluation de quelques propriétés biologiques de trois espèces de l'Euphorbia. Université Badji Mokhtar- Annaba. Thèse de doctorat. 139 pages, pp. 11.

Zhao Zhendong, Xu Shichao, Zhu Shouji, Wang Jing, Bi Liangwu, Chen Yuxiang, Lu Yanju et Gu Yan, 2020. 1,8 - bis (Schiff base) -p - menthane derivatives as well as preparation method and applications thereof. *United States Patent*, vol. 10, p. 674-723.

Zhu J., Zhang Z., Miao C., Liu W., et Sun W., 2017. Synthesis of benzimidazoles from o - phenylenediamines and DMF derivatives in the presence of PhSiH₃. *Tetrahedron*, vol.73(25), p.3458–3462.

Ziani B. E. C., Barros L., Boumehira A. Z., Bachari K., Heleno S. A., Alves, M. J., et Ferreira, I. C. F. R. 2017. Profiling polyphenol composition by HPLC-DAD-ESI/MSⁿ and the antibacterial activity of infusion preparations obtained from four medicinal plants. *Food & Function*, vol.9(1), p.149–159.

Ziani B. E. C., Calhelha R. C., Barreira J. C. M., Barros L., Hazzit, M., et Ferreira I. C. F. R. 2015. Bioactive properties of medicinal plants from the Algerian flora: Selecting the species with the highest potential in view of application purposes. *Industrial Crops and Products*, vol.77, p.582–589.

