

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

Université de Saida Dr. Moulay Tahar
Faculté des sciences
Département de Biologie



Laboratoire de Biotoxicologie, Pharmacognosie et Valorisation Biologiques des
Plantes (LBPVBP)

Mémoire présenté en vue l'obtention du diplôme:

Master en Biologie

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Thème

Contribution à l'étude de l'inhibition de
l'activité enzymatique relative des Métallo-
Béta-Lactamases par l'extrait des feuilles
d'*Olea europaea*

Présenté par : M^{lle} BOUGUETAIB Djehida

M^{lle} SALEM ATIA Farah Nouria

Soutenue publiquement le 28 /06/2018

Devant le jury :

BENREGUIEG Mokhtar	Maitre de conférences classe B	Président
AMARA Sabrina	Maitre-assistant classe A	Examineur
HALLA Noureddine	Maitre-assistant classe A	Encadreur

Année Universitaire : 2017-2018



Remerciements:

*Nous remercions Allah qui nous a donné le courage, la volonté,
Et la patience pour terminer ce travail.*

*Dans ce même contexte, nous tenons à exprimer notre profond gratitude au Dr.
Halla Noureddine Zui a dirigé ce travail pour sa disponibilité, Son aide et
ces précieux conseils.*

*Nous voudrions également nos remerciements aux membres du jury d'avoir
d'accepte d'examiner ce travail :*

*Nos remerciements à Dr. AMARA Sabrina d'avoir accepté d'être
examinatrice de ce travail, nous lui adresse une mention spéciale pour son aide
précieuse durant la réalisation de notre travail.*

*Dr. BENREMMEG Mokhtar nous fait l'honneur d'accepter de présider ce
jury. Qu'il nous permette de lui exprimer notre respectueuse gratitude.*

*Nous remercions sincèrement tous nos enseignants, qui grâce à eux en est arrivé
à ce que nous sommes,*

Cela grâce à leurs conseils, éducation durant notre Formation.

Enfin nous remercions toutes

*Les personnes qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail
spécialement laborantin Ahmed, chef service de laboratoire d'analyse de centre
médical Ahmed Medagheri- Saida-, le centre médical de Mécheria.*

Nous adressant nos remerciements les plus vifs aux membres de jury

Zui nous ont fait l'honneur

De bien vouloir examiner ce travail.



Dédicace :

Arrivé au terme de ce modeste travail, grâce à Allah Il n'est très agréable de le dédié à :

À la plus belle créature que Dieu a créée sur terre,

À la source de tendresse, de patience et de générosité : ma mère

À Mon cher père qui est sacrifié leur vie pour ma réussite et

M'a éclairé le chemin par leur conseil judicieux. J'espère qu'un jour, je pourrais leur rendre un peu de ce qu'il fait pour moi.

À ma deuxième parent :hakoum et Farida

À mes chers sœurs : Mebarka farch, nour el-houda ,wiaam, samah Mastoura.

À mes chers frères: Abdallah, Abdighani, lghressi, djawed , sid ahmed.

À mon fiancé Tarik

À très chers mes amis : samira,houaria , choumaisa, asma, houda ,hanan ,karima, marwa, souria, amal,ghania, bouchra, somiya , hadjer à tout la promotion Microbiologie

Appliquer

À mes tantes : Karima, Fatiha, Abbassia, yakout, talya, Dhaiba

À Mon encadreur Dr Halla pour ses directives, conseils et encouragements

À toutes la famille : bouquetaib, khellafi et Badaoui , .selmoun, otman qu'ils vont trouver ici l'expression de mes sentiments de respect et de reconnaissance pour le soutien qu'ils n'ont cessé de me porter spécialement a et Badaoui farida que je prie le bon Dieu de la bénir , et tous ceux que nous avons oublié de citer, nous leurs dédions ce travail a tous nos camarades de l'école de formation supérieure paramédicale de Saïda

Enfin, À tous ceux et celles qui nous ont aimé, et aidé à élaborer ce travail par leur soutien morale, qu'ils et soient assurés de mon fidèle souvenir. .

Bouquetaib Djehida.



Dédicace :

Arrivé au terme de ce modeste travail, grâce à Allah Il n'est très agréable de le dédié à :

À la plus belle créature que Dieu a créée sur terre,

À la source de tendresse, de patience et de générosité : ma mère et ma grand mère qui est sacrifiées leur vie pour ma réussite et

M'a éclairées le chemin par leur conseil judicieux. J'espère qu'un Jour, je pourrais leur rendre un peu de ce qu'il fait pour moi.

À Mon cher père

L'ami proche de ma famille : Lakhder .

À ma deuxième famille : Baraki.

À mes chers sœurs : Choumeysa

À mes chers frères: Mokhter, sid Ahmed, Mohamed, Sliman.

Mes amis proches : Djehida, Houaria, Amina, Mebaraka , nour el-houda , wiaam,

Aicha, Imane, Kawther, Yasser, Tariq.

à tout la promotion Microbiologie Appliquer

À mes tantes : Nouha, Soumia, Maghnia, Saadia, Safia, Farida.

À Mon encadreur Dr Halla pour ses directives, conseils et encouragements

À toutes la famille : Salem Atia, Ben dahou

Enfin, À tous ceux et celles qui nous ont aimé, et aidé à élaborer ce travail par leur soutien morale, qu'ils et soient assurés de mon fidèle souvenir. .

Salem Atia Farah.

Résumé :

Le but de cette étude était de rechercher des nouveaux inhibiteurs de l'activité enzymatique des Métallo-Béta-Lactamases (MBL) à partir de l'extrait des feuilles d'*Olea europaea* (Olive). Nous nous sommes intéressés à isoler et identifier des souches productrices des MBL à partir de l'hôpital de Mèchria (Naama). Le test de CDT est utilisé pour le screening de ces souches. Cependant, l'examen microscopique, les tests biochimiques et la galerie API sont employés pour leur identification. En outre, nous avons extrait des molécules potentiellement inhibitrices des MBL à partir des feuilles d'olive par une extraction sélective liquide-liquide. L'analyse quantitative a été effectuée pour déterminer le taux des flavonoïdes. La dernière étape de notre travail consiste à une semi-purification des MBL pour l'étude de leur cinétique enzymatique en absence et en présence de l'extrait des feuilles d'olive. 9 souches ont été prélevées. Deux souches ont révélé un résultat positif par CDT qui signifie leur propriété productrice des MBL. Une seule souche a été choisie pour l'étude de la cinétique enzymatique. Le résultat d'identification a montré que la souche sélectionnée était *Cellulomonas spp micobactérium*. Le rendement de l'extrait préparé à partir des feuilles d'*Olea europaea* était de l'ordre de 49.8% où le taux des flavonoides était de l'ordre de $18.36 \pm 0.04 \mu\text{g EC} / \text{g MS}$. Le résultat de la cinétique enzymatique a indiqué que l'extrait des feuilles d'*Olea europaea* inhibe incompétitivement les Métallo-Béta-Lactamases semi-purifiées à partir de la souche *Cellulomonas spp micobactérium*.

Mot clés : Metallo-béta-lactamase, Imipenème, Pénicilline, feuille d'*Olea europaea*, *Cellulomonas spp*.

Abstract

The aim of this study was to search for novel inhibitors of enzymatic activity of the metallo-beta-lactamase (MBL) from *Olea europaea* leaf extract (Olive). We focused on isolating and identifying MBL producing strains from the Mechria Hospital (Naama). The CDT test is used for the screening of these strains. However, microscopic examination, biochemical tests and the API gallery are used for their identification. In addition, we extracted molecules potentially inhibitory MBL from olive leaves by a selective liquid-liquid extraction. Quantitative analysis was performed to determine the flavonoid level. The last step of our work consists of a semi-purification of the MBL for the study of their enzymatic kinetics in the absence and in the presence of the extract of the olive leaves. 9 strains were taken. Two strains revealed a positive result by CDT which signifies their MBL producing property. Only one strain was chosen for the study of enzymatic kinetics. The identification result showed that the selected strain was *Cellulomonas* spp *micobacterium*. The yield of the extract prepared from the leaves of *Olea europaea* was of the order of 49.8% where the rate of flavonoids was of the order of 18.36 ± 0.04 $\mu\text{g EC} / \text{g DS}$. The result of enzymatic kinetics indicated that the *Olea europaea* leaves extract inhibits incompetitively semi-purified Metallo-Beta-Lactamases from the *Cellulomonas* spp *micobacterium* strain.

Key words: Metallo-beta-lactamase, Imipenem, Penicillin, *Olea europaea* leaf, *Cellulomonas* spp.

المخلص :

نستهدف في هذه الدراسة البحث عن مثبطات جديدة للنشاط الأنزيمي للميتالوبيطالكتماز عن طريق مستخلص أوراق الزيتون (*Olea europaea*). ركزنا على عزل وتحديد السلالات المنتجة للميتالوبيطالكتماز من مستشفى دائرة المشرية (ولاية النعامة). استخدمنا اختبار CDT لفحص هذه السلالات وانتقاء تلك المنتجة لهذه الإنزيمات. بعدها ، قمنا باستخدام الفحص المجهرى والاختبارات البيوكيميائية ومعرض API لتحديد هويتها. بالإضافة إلى ذلك ، استخرجنا جزيئات من المحتمل أن تثبط MBL من أوراق الزيتون عن طريق تقنية الإستخلاص السائل-السائل الانتقائي. تم إجراء التحليل الكمي لتحديد مستوى الفلافونويد. وكمرحلة نهائية من عملنا قمنا بشبه انتقاء لإنزيمات الميتالوبيطالكتماز لدراسة حركيتها في غياب وكذا في وجود مستخلص أوراق الزيتون. تم عزل 9 سلالات. في حين كشفت سلالتان فقط نتيجة ايجابية باختبار CDT الذي يدل على إفرازها للإنزيمات المرغوبة. تم اختيار سلالة واحدة فقط لدراسة حركية الأنزيمات. وأظهرت نتيجة تحديد الهوية أن السلالة المختارة هي *Cellulomonase spp micobacterium* . لقد كان العائد من المستخلص المحضر من أوراق الزيتون حوالي 49.8% في حين كان معدل الفلافونويد حوالي 18.36 * 0.04 ميكروغرام معادل للكاتشين/ غرام مادة جافة. وأشارت نتيجة حركية الإنزيم أن مستخلص أوراق يثبط بشكل غير تنافسي لإنزيمات الميتالوبيطالكتماز الشبه منتقاة من سلالة *Cellulomonase*.

الكلمات المفتاحية : الإيمبيينيم، إنزيمات الميتالوبيطالكتماز، البنسلين، أوراق الزيتون، سلالة

Cellulomonase.

Introduction

Les antibiotiques ont longtemps été considérés comme des armes efficaces pouvant éradiquer toute maladie infectieuse d'origine bactérienne. Toutefois, l'utilisation abusive de ces composés dans le domaine médical a eu pour conséquence l'apparition progressive d'une multitude de résistances chez les microorganismes. Les β -lactamines sont les antibiotiques les plus utilisés en clinique. La résistance bactérienne aux β -lactamines est due principalement à la production d'enzymes (β -lactamases) capables d'hydrolyser l'anneau β -lactame commun à tous les molécules de cette classe d'antibiotiques. Ces enzymes sont divisées en deux grands groupes, les serine beta-lactamases et les métallobeta-lactamases dont l'activité revient essentiellement à l'acide aminé serine du site actif et à un ou deux atomes de zinc, dans l'ordre. Plus de 80 métallobeta-lactamases distinctes ont été identifiées dans le monde; 75% d'entre eux sont codées par des plasmides. La dissémination des B-lactamase communes et l'apparition de nouveaux enzymes ou d'enzymes mutants sont reliées directement à l'utilisation abusive des B-lactamine dans le domaine de la santé humaine et animale et en agriculture [(**Kunin et al. 1990**) ; (**Witte, 1997**) ; (**Normark and Normark, 2002**)].

L'approche thérapeutique la plus utilisée en clinique est l'utilisation de la combinaison des inhibiteurs suicides (acide clavulanique, sulbactame et tazobactames) des B-lactamase avec les pénicillines. Ces combinaisons inhibent la croissance des bactéries produisant les B-lactamases de la classe A d'**Ambler (1980)** tels les enzymes du type TEM (Temoniera), SHV (sulfhydryl variable), qui sont généralement des B-lactamases à médiation plasmidique des bacilles à Gram négatif. Aujourd'hui, comme signalé plus haut, à la classe A des B-lactamase on ajoute la classe C, les MBL et certaines enzymes de la classe D qui ne sont du tout pas inhibées par ces inhibiteurs. Bien plus les bactéries produisant plusieurs B-lactamines de la classe A sont résistante à l'action de ces combinaison [(**Bush et al., 1995**) ; (**Bush, 2002**) ; (**Miller et al. , 2001**) ; (**She et Liu, 2002**) ; (**Yang, 1998**)].

Aujourd'hui, la résistance des bactéries aux antibiotiques est devenue l'un des problèmes les plus importants des thérapeutiques anti-infectieuses dans le monde et dans l'industrie pharmaceutique. Les infections causées par les bactéries résistantes aux antibiotiques, sont responsables d'un taux élevé de morbidité et de mortalité, comparé aux infections causées par les bactéries sensibles aux antibiotiques. En plus, le traitement annuel des infections causées par les bactéries résistantes devient de plus en plus coûteux. Afin de faire face à ce problème de coût, les populations démunies se sont retournées vers la médecine traditionnelle d'un moindre budget. Le coût de traitements annuel des infections causées par les germes résistants aux antibiotiques, la plupart des populations des pays en voie de développement se tournent vers la médecine traditionnelle. Cette médecine constitue une part intégrale de la culture de l'Afrique et selon les estimations de l'OMS (2002), la majorité de la population africaine (80%) utilise la médecine traditionnelle dans les soins de santé primaire.

Le but de ce travail est de caractériser les différents types de métallo-béta-lactamases produites par des souches proviennent de divers prélèvements au niveau d'hôpital de Mècheria et de rechercher de leurs potentiels inhibiteurs par de l'extrait des feuilles de la plante médicinale *Olea europaea* (olivier), utilisée par la population dans le traitement de plusieurs maladies.

Première partie

*Revue
bibliographique*

Chapitre I

Généralités sur les métallo- bêta-lactamases

Chapitre I : Généralités sur les métallo- β -lactamases

Les Metallo- β -lactamases (classe moléculaire B, groupe 3 de la classification fonctionnelle) sont des protéines monomères ou oligomères qui nécessitent un cofacteur de métal (Zn dans les enzymes natives) pour l'activité et sont structurellement et évolutionnairement sans rapport avec le site actif de sérine β -lactamases. La pertinence du métallo- β -lactamases en tant qu'effecteurs de résistance est principalement due à leur spécificité au substrat, qui comprend toujours des carbapénèmes et souvent aussi céphalosporines et pénicillines, et à leur résistance aux inhibiteurs de la sérine β -lactamase (Altschul et al., 1992). En 1966, Sabath et Abraham avaient mis en évidence une activité céphalosporinase dans des préparations brutes de pénicillinases, à partir de *Bacillus cereus* 569 et cette activité, perdue au cours de la purification, est restaurée par addition du sulfate de zinc (1 mM finale) selon ces auteurs cette activité céphalosporinase revenait à une enzyme chromosomique (Sabath et Abraham, 1966).

En 1980, la découverte de ce type d'enzyme dans des espèces de pertinence clinique c'est-à-dire pathogène (*Stenotrophomonas maltophilia*; quelques souches de *Bacteroides fragilis* et *Aeromonas spp*) a progressivement changé ce point de vue. Par conséquent, un intérêt important a été accordé par la suite à ce type d'enzyme, incité par deux propriétés relatives fonctionnelles à savoir l'activité carbapénémase et l'insensibilité aux inhibiteurs classiques de sérine- β -lactamase (acide clavulanique, acide pénicillanique, sulfones, etc.). En 1982, Saino et ses collaborateurs mirent en évidence une activité pénicillinase prépondérante et dégradante de l'imipénème chez des souches de *Stenotrophomonas maltophilia*. Cette activité revient, en fait, à une enzyme chromosomique inductible et n'est active qu'en présence du zinc. Pour ces chercheurs il s'agit d'une métallo-enzyme qu'ils ont désignée β -lactamase (Saino et al., 1982).

1. Définition des Métallo- β -lactamases (MBLs) :

La bêta-lactamase (β -lactamases) est une enzyme possédant la capacité de dégrader spécifiquement tous les antibiotiques appartenant à la famille des bêta-lactamines (Maria et al., 2016). Les β -lactamases sont la cause la plus fréquente de résistance chez les bactéries à Gram négatif (Anne et Brigitte, 2012). Elles hydrolysent les β -lactamines en ouvrant le cycle bêta lactame et menant à la perte d'un groupement carboxyle, provoquant l'inactivation de l'antibiotique en question (Figure 01) (Ambler, 1980). Ces enzymes sont localisées au niveau de l'espace périplasmique chez les bactéries Gram négatif (Medeiros, 1984). La présence de ce type de mécanisme de résistance au sein de souches pathogènes fait peser un risque majeur d'inadéquation thérapeutique et donc d'échec thérapeutique (Schwaber et Carmeli, 2007), et est également un facteur de diffusion.

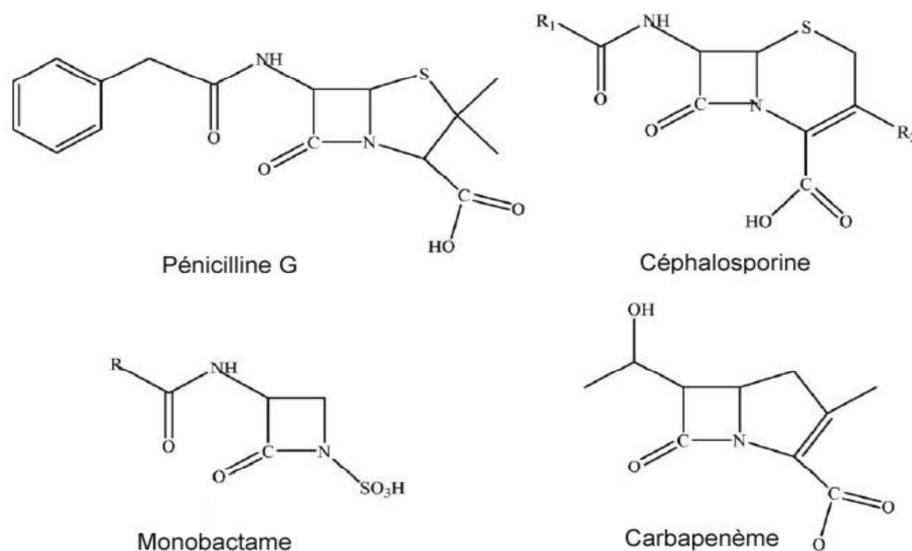


Figure 01 : Cycle d'un anneau β -lactame et les structures du noyau de base des β -lactamines

(Babicet al., 2006)

La classe des Métallo- β -lactamases (MBLs) est longtemps restée au stade de curiosité biochimique, elle se caractérise par un large spectre d'activité envers les β -lactamines. A l'exception des mono lactâmes, elles sont capables d'hydrolyser toutes les classes de β -lactames, y compris les carbapénèmes (antibiotiques utilisés en thérapie intensive en milieu clinique). Cependant, ces enzymes sont inactivées par des chélateurs de métaux comme l'Ethylène Diamine Tétra-Acétique (EDTA), l'acide dipicolonique, la phénantroline. Il est aussi intéressant de noter que la majorité des gènes codant pour ces enzymes sont d'origine plasmidienne et qu'elles sont facilement transférables entre les souches bactériennes par le phénomène de conjugaison ou de transposition. Les MBLs peuvent se disséminer facilement et permettre la propagation des résistances aux carbapénèmes (Galleni et al.,2001).

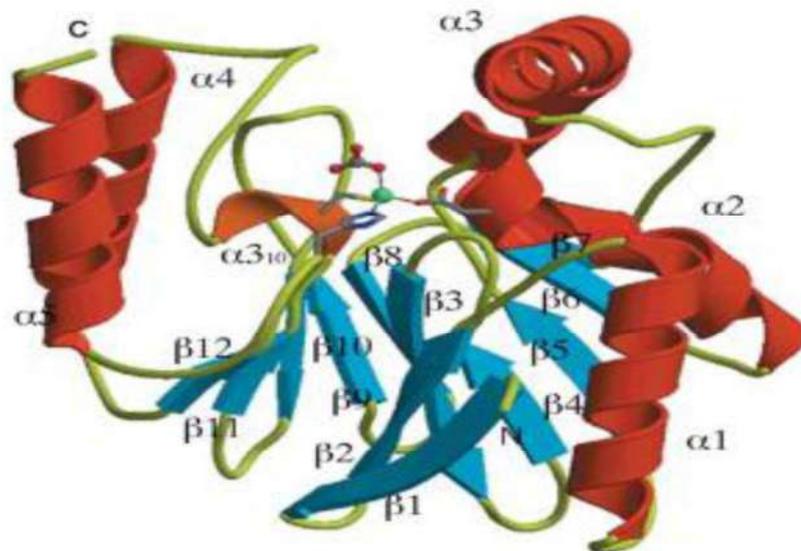


Figure 02 : Structure tétramérique d'une MBL de *Stenotrophomonas maltophilia* reconstitué en rubans. Les ions zinc sont présentés comme des sphères grises et les sous-unités individuelles identifiées par couleur (Ullahet al, 1998).

2. Propriétés structurales des MBLs:

2.1. La protéine :

Les métallo-bêta-lactamases sont des hydrolases qui contiennent en minimum 230 résidus d'acides aminés. Le poids moléculaire varie entre 25 et 118 KDa, leurs points Isoélectriques varient entre 2,5 et 10,5 (**Gonzalez et al., 2007**). Les MBLs appartiennent à une plus grande superfamille de métalloprotéines avec diverses fonctions biologiques au-delà de l'hydrolyse des β -lactames, désignée sous le nom de superfamille des métallo-hydrolases/oxydoréductases dans la base de données (**Rossellini et Docquier, 2007**).

Une caractéristique structurale commune conservée dans cette superfamille est le repliement global de la protéine $\alpha\beta/\beta\alpha$, dans lequel un sandwich de feuille β mixte interne est entouré par des hélices exposées au solvant. Les comparaisons structurales de séquences sont cohérentes avec la proposition que les sérines β -lactamases ont évolué à partir des transpeptidases ancestrales, mais l'histoire évolutive des MBLs, qui ne sont pas homologues aux transpeptidases, est plus ambiguë. La double pseudo-symétrie des moitiés N-terminale et C-terminale des MBLs suggère que les deux moitiés peuvent provenir d'un ancien événement de duplication génique. Dans les MBLs, le site actif contenant du zinc est positionné dans une rainure peu profonde formée à l'interface des feuilles β centrales. Les structures cristallines des β -lactamases révèlent un groupe d'ions métalliques mono ou dinucléaires dans lequel Zn1 est habituellement coordonné avec la géométrie tétraédrique, et Zn2 avec une géométrie bipyramidale trigonale lorsque le ligand du substrat ou du produit est absent (**Bebrone, 2008**).

Dans les structures des MBLs monozinc B1, le site Zn1 est occupé par l'unique ion zinc. Dans les structures de MBD de dizinc B1 avec des affinités différentes pour chaque site, Zn1 est typiquement raffiné avec une occupation moyenne plus élevée que Zn2, en accord avec les

études biochimiques attribuant Zn² comme le site le plus faiblement liant. Dans d'autres MBL B1, il a été montré que le site dizinc lient les deux ions de zinc avec une coopérativité positive, avec une liaison de la première liaison améliorant l'équivalent de la seconde. Certaines structures cristallines de la β -lactamase B1 NDM-1 révèlent également un troisième ion zinc (Zn³) lié au bord du site actif, positionné à environ 8 Å de l'amas de zinc d'inculcaire. Cependant, la pertinence fonctionnelle de Zn³ n'a pas été établie et il pourrait s'agir d'un artefact de cristallisation. Les «seconds ligands du zinc de la coquille», qui interagissent directement avec les ligands de zinc primaires, sont plus variés que les ligands de zinc primaires et peuvent contribuer aux propriétés différentes des sites de zinc des MBL B1. En plus des ligands de zinc primaires, plusieurs caractéristiques remarquables du site actif semblent être structurellement conservées parmi les MBL IMP-1, VIM-1 et NDM-1 B1 représentatives, malgré les identités de séquence d'acides aminés globales relativement faibles (VIM-1: IMP-1: 31%, NDM-1: IMP-1: 30%, VIM-1: NDM-1: 31%). Premièrement, une chaîne latérale chargée positivement (Lys224 dans IMP-1 et NDM-1 ou Arg228 fournie à partir d'une position de séquence différente dans VIM-2) est située à environ 6 Å de Zn² et fournit probablement un contre-ion pour le carboxylate conservé trouvé dans tous les médicaments β -lactamines. Deuxièmement, un résidu Asn est structurellement conservé dans chacun de ces trois MBL B1, et cette position (Asn233), trouvée dans la boucle de site actif 10 (ASL10), est montrée être à la distance de liaison H du carboxylate nouvellement formé dans l'anneau produits de β -lactame ouverts. Toute la numérotation des résidus dans cette revue est standardisée selon la numérotation BBL standard et un alignement NDM-1 publié ailleurs (Figure 5). Troisièmement, dans les trois β -lactamases, une boucle β -épingle à cheveux prolongée (boucle de site actif 3, ASL3) domine d'un côté du site actif, fournissant une large surface hydrophobe pour lier les structures cycliques du β -lactame substrats. En général, cette boucle est plus désordonnée que le reste de la protéine et a été démontrée

devenir rigide et se fermer sur les ligands de site actif de liaison. Enfin, dans les trois exemples, une rainure peu profonde dans la surface de la protéine s'étend de chaque côté de la grappe de dizincs, permettant un espace suffisant pour accueillir les substitutions variées trouvées dans la large gamme de substrats de β -lactame contenant des substituants structurels. Le lactame à quatre chaînons dans une direction (loin de Zn1), ou s'étendant de la position 2 (dans les pénams, les clavams, les pénèmes et les carbapénèmes) ou la position 3 (dans les céphèmes) dans l'autre sens (loin de Zn2). Les efforts récents visant à comprendre comment les modifications de ces caractéristiques structurelles et d'autres caractéristiques structurelles des MBL IMP, VIM et NDM ont un impact sur la catalyse, la stabilité et la résistance ultérieure aux antibiotiques sont abordées ci-dessous (**Maria et al., 2016**).

2.2. Site actif :

Les MBLs possèdent généralement un site actif constitué de résidus d'acides aminés coordonnés à un ou à deux ions zinc. Les MBLs confondues, ces acides aminés sont fréquemment l'asparagine, la cystéine et trois à cinq histidines. Dans la sous-classe B1, le site actif peut être mononucléaire, autrement dit les acides aminés établissent des liaisons avec un seul ion de zinc. Il peut être également bi-nucléaire, autrement dit les acides aminés établissent des liaisons avec deux ions de zinc. Dans le cas du site mono-nucléaire, les acides aminés établissant des liaisons avec le seul ion zinc sont trois résidus histidines (**Fig.3**). Dans le cas du site bi-nucléaire, les acides aminés établissant des liaisons avec le premier ion zinc sont trois histidines; avec le deuxième ion zinc sont des résidus d'asparagine, de cystéine et d'histidine (**Abriataetet al., 2008**). Dans la classe B2, le site actif est toujours du type mononucléaire. Les acides aminés établissent des liaisons avec le seul ion de zinc sont des résidus d'asparagine, de cystéine et d'histidine (**Page et Badarau, 2008**). En fin, dans la classe B3, le site actif peut être mono ou bi-nucléaires. Dans le cas du site mono nucléaire, les acides

aminés établissant des liaisons avec le seul ion zinc sont trois résidus d'histidines. Dans le cas du site bi-nucléaire les acides aminés établissant des liaisons avec le premier ion zinc sont trois histidines [(Bounaga, 1998); (Rossolini et Dcoquier, 2007)]; avec le deuxième ion zinc sont des résidus d'histidine, de sérine et d'histidine (Tableau 01).

Nous signalons que le site actif des MBLs est dénommé par plusieurs termes: on parle de site de l'histidine ou de site Zn1 ou de trois histidines et ou site 3 H lorsque l'ion Zn est lié à trois His. On parle de site de cystéine ou site Zn2 ou Asp, Cys et His et ou de site DCH lorsque l'ion Zn est lié à l'asparagine, à la cystéine et à l'histidine (Zhang et al., 2013).

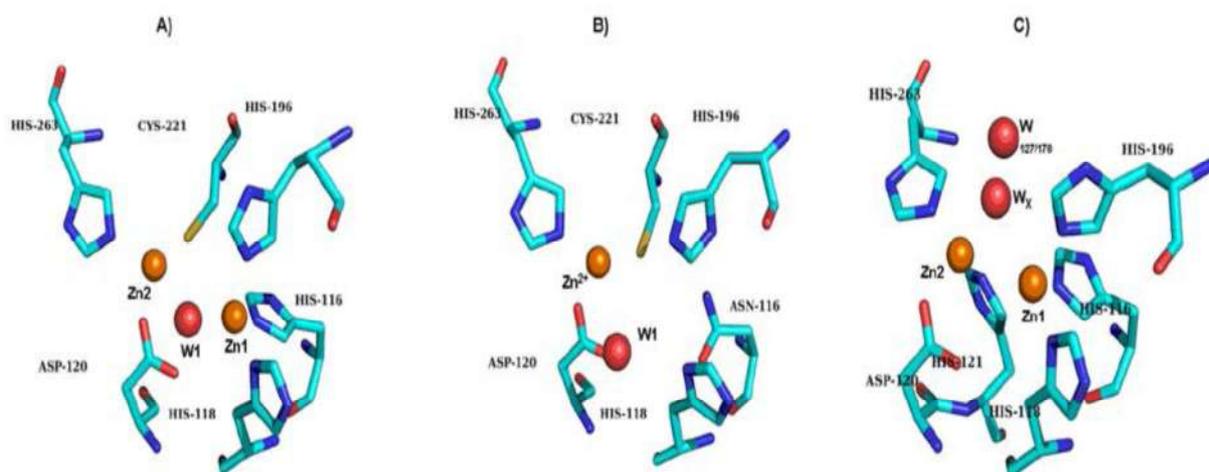


Figure 03: Sites de zinc et architecture des ligands métalliques au site actif; (A) VIM-2 (PDBid: 1KO3, sous-classe B1), (B) CphA (N° PDB: 1X8G, sous-classe B2) et (C) FEZ-1 (PDB n°: 1K07, sous-classe B3). Tous les chiffres ont été générés par PyMol (Bebrone, 2007).

Tableau 01: les résidus d'acides aminés du site actif des trois sous-classes MBLs coordonnés avec les ions du zinc (Galleni et al., 2001).

B-lactamases	Les ligands Zn1	Les ligands Zn2
Sous classe B1	His116 His118 His196	Asp120 Cys221 His263
Consensus BBL*	His86 His88 His149	Asp90 Cys168 His210
Bc II	His77 His79 His139	Asp81 Cys158 His197
IMP-1	His99 His101 His162	Asp103 Cys181 His223
CcrA	His88 His90 His153	Asp92 Cys172 His214
VIM-1	His76 His78 His139	Asp80 Cys158 His200
BlaB	His96 His98 His159	Asp100 Cys178 His220
IND-1		
Sous classe B2	Asn116 His118 His196	Asp120 Cys221 His263
Consensus BBL	Asn69 His71 His148	Asp73 Cys167His205
CphA	Asn72 His74 His151	Asp76 Cys170His212
Sfh-1		
Sous classe B3	His/Gln116 His118 His196	Asp120 His121His263
Consensus BBL	His84 His86 His160	Asp88 Cys89 His225
L1	His71 His73 His149	Asp75 Cys76 His215
FEZ-1	Gln80 His82 His157	Asp84 Cys85His213
GOB-1	His105 His107 His185	Asp109 Cys110 His253
THIN-B		

*BBL : - β -Lactamase classe B

3. Classification des MBLs :

Les Metallo-β-lactamases (classe B des bêta-lactamases) sont subdivisées en trois sous-classes définies principalement par des différences dans la coquille primaire de coordination du zinc (Maria et al., 2016).

3.1. Sous-classe B1 :

La sous-classe B1 lie un ion de zinc (Zn1) avec trois résidus His (H116, H118, H196) et un second ion zinc (Zn2) avec trois résidus différents, notamment un Cys (D120, C221, H263). Les B-lactamases B1 contiennent le plus grand nombre de membres cliniquement pertinents, y compris les VIM (MBL codée par l'intégrine de Vérone), les IMP (imipénémase) et les NDM (New Delhi MBL), entre autres (Maria et al., 2016).

3.2. Sous-classe B2 :

Les β-lactamases de la sous-classe B2 ont un site de liaison Zn1 avec un résidu altéré (N116, H118, H196), mais conservent un site Zn2 similaire (D120, C221, H263). Cette sous-classe possède le nombre le plus faible comprend des enzymes produites par différentes espèces d'*Aeromonas*, telles que *A. hydrophila* CphA (*Aeromonas* carbapenem-hydrolysant la β-lactamase), *A. veronii* ImiS (imipénème hydrolysant la métallo-β-lactamase de *A. veronii* bv Sobria) et *Serratia fonticola* Sfh-I (MBL hydrolase de *Serratia fonticola*) entre autres. Enfin, les β-lactamases de la sous-classe B3 ont un site de liaison de Zn1 varié (H / Q116, H118, H196) et un site de liaison Zn2 distinctif dépourvu de résidu Cys (D120, H121, H263). Cette sous-classe comprend les MBL de *Stenotrophomonas maltophilia* L1 (β-lactamase 1) et d'*Elizabethkingia meningosepticum* (*Chryseobacterium meningosepticum*) GOB-1 (β-lactamase de classe B de *E. meningosepticum*). Malgré la faible conservation des MBL

(typiquement <25% d'acides aminés), ils présentent tous un repliement similaire et partagent des similarités mécaniques, comme décrit ci-dessous. Contrairement à la plupart des enzymes de classe (A, C et D) les MBL B1 ont des profils de substrat inhabituellement larges et peuvent inactiver pratiquement tous les β -lactames bicycliques cliniquement utilisés (**Maria et al., 2016**).

3.3. Sous classe B3 :

Les enzymes de la sous-classe B3 sont codées pour la plupart en chromosomes des bactéries environnementales, par exemple L1, FEZ-1 et BJP-1. Le blaAIM-1 est le premier qui a rapporté la sous-classe B3 d'un pathogène humain cliniquement pertinent, *P. aeruginosa*. Les structures enzymatiques de la sous-classe B3 ont la caractéristique de replier $\alpha\beta/\beta\alpha$, mais elle diffère dans les régions de la boucle et de l'architecture du site actif par rapport à la sous-classe B1 et B2. En outre, AIM-1 a un résidu Gln157 unique qui n'est pas observé pour d'autres MBL. Ici, nous avons résolu la structure tridimensionnelle de la B3 MBL AIM-1 à 1,60 Å, AIM-1-3mol à 1,80 Å, mutant AIM-1-Gln157Ala à 1,73 Å, et AIM-1-Gln157Asn à 1,40 Å résolution pour étudier la structure et relation fonctionnelle vers des efficacités catalytiques plus élevées de AIM-1 par rapport à autres MBL de la sous-classe B3 (**Saradhi, 2012**).

4. Différents types des Métallo-bêta-lactamases :

Le métallo-bêta-lactamases de type verona imipénémase (VIM) : la métallo-bêta-lactamase VIM-2 semble être l'enzyme prédominante chez *P. aeruginosa*. Des épidémies nosocomiales à *P. aeruginosa* productrice de VIM-2 ont été décrites partout dans le monde. Récemment, une étude a rapporté une dissémination importante des souches *P. aeruginosa* productrices de VIM-2 responsables d'infections communautaires à unité de soins de l'hôpital militaire central d'Alger, en Algérie (**Frederi et al., 2010**). Avec des souches d'*E. coli* et *Klebsiella*

pneumoniae et des études récentes ont montré la dissémination internationale de complexes clonaux de *P.aeruginosa*, tels que CC111 et CC235, porteurs de différents déterminants de résistance particulièrement VIM-2(mais aussi PER-1, GES-5, VIM-4, VIM-13, IMP-1) localisées dans différents éléments génétiques mobiles (intégrons, transposons, plasmides), suggérant que cette diffusion pandémique de *P. aeruginosa* multirésistante aux antibiotiques est liée à la dissémination de clones épidémiques et à l'acquisition locale de déterminants de résistance (Maria et al., 2016).

➤ **Les enzymes de type IMP** de pleine longueur sont généralement constituées de 246 résidus d'acides aminés, sauf IMP-9, -11, -21, -31, -41, -44 et -45, qui contiennent 245 résidus, et IMP-37, qui est de 248 acides aminés de longueur. La protéine IMP-1 mature contient 228 résidus et a une masse moléculaire de 25 kDa. À ce jour, 47 variantes d'IMP-1 sont attribuées, bien que seulement 41 séquences de protéines soient disponibles au public. Quatre variantes naturelles du groupe IMP-1 (IMP-6, -25, -10 et -30) sont caractérisées de manière extensive. IMP-6 diffère d'IMP-1 par une mutation S262G dans le site actif, et IMP-25 diffère d'IMP-6 par une mutation supplémentaire de G235S sur l'ASL10. Fait intéressant, l'IMP-1 confère des niveaux de résistance plus élevés à l'imipénème et à plusieurs autres antibiotiques, alors que l'IMP-6 confère des niveaux de résistance plus élevés au méropénème et au doripénème. IMP-25, qui pourrait être un dérivé d'IMP-6, confère la plus grande résistance au méropénème. Compte tenu de l'augmentation de la relation d'activité entre ces enzymes, on suppose que l'IMP-6 est l'enzyme ancêtre, à partir de laquelle IMP-1 et IMP-25 ont évolué. Ainsi, les mutations cumulatives G262S à G262S / G235S représentent une voie évolutive possible en réponse à l'utilisation clinique croissante du méropénème. Ser262, un second résidu de coquille, est situé à proximité du ligand de zinc primaire His263. La modification de la spécificité du substrat conférée par la substitution G262S a été expliquée

comme un «effet domino»: la présence de Ser262 soutient His263, préservant la coordination de l'ion zinc, stabilisant ainsi le complexe enzyme-substrat intermédiaire, améliorant la conversion des β -lactamines en des groupes R2 volumineux ou chargés positivement comme la ceftazidime, les pénicillines et l'imipénème. Fait intéressant, dans une étude récente (**Page et al., 2008**).

➤ **Les enzymes de type NDM** : a une longueur totale de 270 résidus. Un NDM-1 mature est composé de 254, 252, 250 ou 234 résidus d'acides aminés, avec une masse moléculaire correspondante comprise entre 29 et 27 kDa. La NDM-1 partage très peu d'identité de séquence avec d'autres MBL et elle est plus étroitement apparenté à VIM-1 / VIM-2, avec lequel il partage 32% d'identité de séquence d'acides aminés. A ce jour, 12 variants ont été attribués, dont 10 séquences protéiques ont été publiées. La caractérisation initiale de NDM-1 par A souligné certaines caractéristiques uniques de cette MBL. Par exemple, NDM-1 a une insertion de séquence (FAAN) entre les résidus 160 et 164, une Ala entre les deux résidus His dans le motif HXHXD définissant des MBL, et un Tyr à la position 242 plutôt que le Trp conservé. Comparé à VIM-2 et IMP-1, NDM-1 a des valeurs KM et kcat inférieures pour la plupart des substrats de β -lactame, à l'exception de l'imipénème et du méropénème (**Yong et al., 2009**).

5. Inhibiteurs des Métallo-béta-lactamases

Tous les inhibiteurs ou inactivateurs connus des β -lactamases à sérine sont inefficaces vis-à-vis des métallo- β -lactamases. Les inactivateurs rapportés de toutes les métallo- β -lactamases sont les chélateurs de métaux EDTA, o-1, 10-phénanthroline et acide dipicolinique, mais ceux-ci n'ont aucune signification clinique. La propagation des métallo- β -lactamases parmi les souches bactériennes nosocomiales justifie la recherche de composés pouvant contrarier l'activité de ces enzymes. Malheureusement, la découverte d'un inhibiteur spécifique

cliniquement utile des métallo- β -lactamases est rendue difficile par le fait que ce composé doit rester inactif vis-à-vis des protéines humaines membres de la superfamille des métallo- β -lactamases ou d'autres métallo-enzymes, comme l'enzyme de conversion de l'angiotensine. Une autre difficulté est de trouver un composé actif sur l'ensemble des trois sous-classes de métallo- β -lactamases et même sur toutes les enzymes au sein d'une même sous-classe. Actuellement, les inhibiteurs connus inhibent efficacement une ou deux métallo- β -lactamases et sont beaucoup moins actifs contre les autres (**Toney, 2001**).

Quelques exemples sont des dérivés de thioesters, des alcools trifluorométhyliques et cétoniques, des hydrazonessulfonyliques, des produits naturels tricycliques, des dérivés de l'acide succinique, des biphényltétrazoles, des cystéinylpeptides, des carbapénèmes et des dérivés de pénicilline parmi lesquels un intéressant inhibiteur de pénicilline thiol des céphalosporines, des thiols simples tels que l'acide mercaptoa-cétylique et les thioesters, l'acide thiomandélique, le captopril, les dérivés de l'acide benzohydroxamique, les pyridine carboxylates (**Bebrone, 2008**).

Parallèlement, la recherche sur les bêta-lactamases a permis de comprendre le fonctionnement de ces enzymes et de mettre au point des stratégies pour lutter contre la résistance des bactéries.

Chapitre II :

Bactéries Résistantes aux

béta-lactamines

Chapitre II : Bactéries résistantes aux β -lactamines

La résistance aux antibiotiques est devenue un problème majeur de santé publique en Algérie. En effet ces dix dernières années, une importante augmentation de la résistance aux antibiotiques en particulier chez les Gram négatif et rarement les bactéries Gram positif (**Touati et al., 2006**). Les β -lactamases sont la cause la plus fréquente de résistance chez les bactéries à Gram négatif. Plusieurs centaines de β -lactamases ont été décrites et il existe plus d'un système de classification. Les gènes de résistance subissent des mutations et évoluent graduellement. Ils peuvent être situés sur des éléments génétiques mobiles (plasmides et transposons) et dans le chromosome (**Bush et al., 2010**).

1. *Acinetobacter* :

Acinetobacter est un bacille à Gram négatif ne fermentant pas le glucose. Elle est pathogène opportuniste isolée essentiellement dans des unités de soins intensifs chez des patients présentant une immunodéficience locale ou générale, elle est présente aussi dans l'environnement. Cette bactérie appartient au groupe des aérobies strictes, non fermenteurs et immobiles. Elle réduit les nitrates en nitrites, elle a une oxydase – et une catalase + (**Vila et al., 1997**).

➤ Résistance naturelle :

Les souches d'*Acinetobacter* produisent une bêta-lactamase chromosomique, très probablement de classe C, qui n'est pas inhibée par le clavulanate, qui hydrolyse préférentiellement les céphalosporines de première génération mais n'a pas d'activité pour les pénicillines et la pipéracilline. De ce fait, *Acinetobacter* est naturellement résistant à la céphalotine alors que la ticarcilline est active (**Gehrlein et al., 2002**).

➤ **Résistance acquise :**

La résistance aux bêta-lactamines chez *Acinetobacter* est complexe et pose souvent de sérieux problèmes car elle résulte fréquemment de la production simultanée d'enzymes différentes. Des souches d'*Acinetobacter baumannii* résistantes à la plupart des bêta-lactamines (sauf à la ceftazidime et à l'imipénème) ont été caractérisées. Elles produisaient 3 bêta-lactamases différentes : une céphalosporinase chromosomique, une bêta-lactamase TEM-1 et une enzyme de type OXA appelée OXA-21 et portée par un intégron (Perli et al., 1997).

➤ **Bêta-lactamases de type BLSE**

La bêta-lactamase PER-1, qui confère un phénotype de résistance de type BLSE, a été trouvée en Turquie dans 33 (total 72) souches d'*Acinetobacter* (Vahaboglu et al., 1997).

➤ **Résistance à l'imipénème :**

Elle peut être non enzymatique. Elle résulte alors de modifications des PLPs qui entraînent une diminution de leur affinité pour l'imipénème. Plus récemment, une bêta-lactamase de type OXA a été décrite dans une souche d'*Acinetobacter baumannii* résistantes à l'imipénème et produisant deux enzymes : la céphalosporinase chromosomique et une enzyme qui hydrolyse les isoxazolylnicillines et l'imipénème avec une activité élevée (inhibée par les ions Cl^- mais pas par le clavulanate, ni par l'EDTA). L'enzyme se caractérise également par une activité d'hydrolyse significative des céphalosporines de troisième génération (Hornstien et al., 1997).

2. *Aeromonas hydrophila* :

Elle appartient à la famille des *Vibrionaceae* (*Aeromonadaceae*). C'est une bactérie à Gram négatif trouvée dans les eaux, le sol, les aliments. Elle est opportuniste pour les plaies

infectées chez les immunodéficients. Elle a une oxydase +, nitrate réductase +, glucose +, VP +, et une activité d'hémolyse du sang de mouton (β -hémolyse visible sur gélose au sang) (Ruimy et al., 1997).

➤ **Résistance naturelle :**

Chez *Aeromonas*, il y a une production de trois bêta-lactamases chromosomiques co-inductibles : Une céphalosporinase de classe C (AsbA1 chez *A. sobria*, homologue à AmpC de *P. aeruginosa*) ; Une oxacillinase de classe D (AsbB1 chez *A. sobria*, inhibée par l'acide clavulanique et également appelée OXA-12) ; et Une imipénèmase de classe B : CphA chez *A. hydrophila* AsbM1 chez *A. sobria* (également appelée ImiS). Toutes les souches (Khushi et al., 1998).

➤ **Résistance acquise**

Elles produisent des bêta-lactamases de classe A à spectre étendu (BLSE) : la bêta-lactamase TEM-12 a été identifiée dans une souche de *Aeromonas caviae* sur un plasmide auto-transférable. Curieusement, l'enzyme ne s'exprime pas chez *A. caviae* et sa détection n'a été possible qu'après transfert du plasmide dans une souche réceptrice d'*E. Coli* (Edwards et al., 1997).

3. *Bacteroides fragilis* :

Les *Bacteroides* du groupe *fragilis* sont des bacilles à Gram négatif appartenant à la famille des *Bacteroidaceae* qui constituent une famille très importante de bactéries anaérobies, en particulier au niveau du tractus intestinal. Ces bactéries ont en commun de ne pas utiliser l'oxygène comme accepteur d'électron, leur croissance pouvant même être inhibée en présence d'O₂. Les *Bacteroides* sont souvent isolés de suppurations anaérobies, le plus souvent lors de péritonites. *Bacteroides fragilis* est également responsable de septicémies. Le

potentiel pathogène est lié à la production d'enzymes (héparinase, neuraminidase), ainsi qu'à des lipopolysaccharides et polysaccharides capsulaires. Elle est anaérobie obligatoire (ne se développe pas au contact de l'air) et possède une capsule. Elle a une fermentation du glucose +, indole –, et une croissance en présence de bile + (**Korfmann, 1991**).

➤ **Résistance naturelle**

Bacteroides fragilis, comme toutes les bactéries anaérobies, est naturellement résistant aux aminosides (pas de transport actif transmembranaire). Ces bactéries sont généralement résistantes aux bêta-lactamines par production d'une bêta-lactamase chromosomique codée par le gène *cepA*, non inductible, inhibée par le clavulanate et apparentée aux céfuroximes des *Proteus* (dans 70 % des souches) (**Cheng Y.,1994**).

➤ **Résistance acquise**

Il y a très peu de données sur la résistance acquise de *Bacteroides fragilis* aux bêta-lactamines. Une diminution d'affinité des PLPs ont été évoqués pour des souches résistantes à l'imipénème ne produisant pas de métallobêta-lactamases. Une modification dans la composition des protéines de membrane externe et du lipopolysaccharide a été mise en évidence dans les souches qui produisent la métallobêta-lactamase CfiA (**Cheng, 1994**).

4. *Enterobacter* :

La famille des *Enterobacteraceae*, comprenant de nombreuses espèces comme *Enterobacter aerogenes* ou *Enterobacter cloacae*. Elles sont des bacilles à Gram négatif mobiles, et sont souvent responsables d'infections nosocomiales. *E. cloacae* et *E. aerogenes* peuvent être isolés à partir d'infections urinaires ou de plaies (**Stoorvogel J., 1991**).

➤ **Résistance naturelle :**

E. cloacae et *E. aerogenes* sont naturellement résistants à l'amoxicilline, à amoxicilline-clavulanate, à la céfalotine et à la céfoxitine par production d'une bêta-lactamase chromosomique de classe C inductible AmpC. Les souches sauvages restent sensibles à la ticarcilline, à ticarcilline-clavulanate et à la pipéracilline et au céphamandole (**Watanabe, 1991**).

➤ **Résistance acquise :**

Mutants de céphalosporinases de classe C : la production constitutive à haut niveau de la bêta-lactamase chromosomique de classe C est un mécanisme fréquent chez *Enterobacter*. Elle entraîne une résistance additionnelle à la ticarcilline, à ticarcilline-clavulanate, au céfamandole, aux céphalosporines de troisième génération et à l'aztréonam (exemple : *E. cloacae* *E. aerogenes*) (**Bermudes, 1997**).

Bêta-lactamases de classe A à spectre étendu (BLSE) : des bêta-lactamases à spectre de substrat étendu sont de plus en plus fréquemment identifiées dans les isolats cliniques d'*Enterobacter aerogenes* (exemple : *E. aerogenes*). Des enzymes comme SHV-2, CAZ-6 et CTX-1, codées par des gènes plasmidiques, ont été décrites. La détection d'une synergie avec le clavulanate nécessite souvent la réalisation d'un antibiogramme complémentaire (exemple : *E. aerogenes*). *Résistance aux carbapénèmes* : elle est encore rare. On peut l'observer lorsqu'il y a dans une même souche hyperproduction constitutive de la bêta-lactamase de classe C chromosomique et altération de la perméabilité par diminution du niveau de synthèse d'une porine. *Carbapénèmases de classe A* : elles ont été décrites dans deux souches cliniques d'*E. cloacae* qui présentaient une résistance de haut niveau à l'imipénème. Une synergie est observée à l'antibiogramme entre l'imipénème et le disque amoxicilline-clavulanate. Les deux enzymes décrites à ce jour (Nmc-A et Imi-1) se caractérisent par une activité d'hydrolyse élevée vis-à-vis des carbapénèmes et une sensibilité

à l'inhibition par l'acide clavulanique. Génétiquement, elles sont plus proches des β -lactamases de classe A (type TEM, SHV par exemple) que des enzymes chromosomiques de classe C (Tzouvelekis et al., 1994).

5. *Escherichia coli* :

Elle appartient à famille des *Enterobacteriaceae*. On trouve *Escherichia coli* en abondance dans la flore commensale, en particulier dans le tube digestif. Elle est bacille aérobie, à Gram négatif, oxydase négatif, nitrate positif et qui fermente le glucose. Elle est responsable des infections urinaires (impliqué dans 80 % des infections urinaires), Septicémies ; méningites néonatales et infections intestinales (gastroentérites) (Peixe, 1997).

➤ Résistance acquise :

Bêta-lactamase de classe A haut niveau (pénicillinase) :

C'est une résistance à haut niveau vis-à-vis AMX, TIC ; inhibition de l'activité enzymatique par l'acide clavulanique (activité de AMC et TCC > AMX et TIC) ; activité réduite pour les uréidopénicillines (PIP) et les C1G (CF) et les C2G (MA) (Chanal-Claris, 1998).

➤ **Bêta-lactamase de classe A TRI (pénicillinase TRI) :**

Même phénotype qu'*E. coli* pénicillinase haut niveau, excepté la résistance haut niveau à AMC et TCC (pas d'activité d'inhibition de l'acide clavulanique). En milieu hospitalier, on peut trouver jusqu'à 5 % des souches de *E. coli* résistantes au clavulanate (Sirot et al., 1997).

➤ **Bêta-lactamase de classe A à spectre étendu :**

Résistance à l'ensemble des pénicillines et céphalosporines, en particulier aux C3G (CTX, CAZ) et aux monobactames (ATM). L'activité des céphamycines et de l'imipénème n'est pas

modifiée. Une image de synergie (inhibition de l'activité enzymatique par l'acide clavulanique) est souvent détectée entre les C3G et AMC ou TCC (**Hibbert et al., 1994**).

➤ **Hyperproducteur de Bêta-lactamase de classe C (céphalosporinase) :**

Résistance à AMX mais les carboxypénicillines (TIC) et les acylurédopénicillines (PIP) restent actives. Pas d'inhibition par le clavulanate \Rightarrow résistance à AMC mais TCC reste actif. Résistance de haut niveau aux C1G (CF). Activité toujours diminuée (voir résistance de haut niveau) aux céphalycines (FOX). L'activité des C2G, des C3G est légèrement diminuée, celle de l'imipénème (IP) reste normale. On peut noter que l'activité de l'amoxicilline et des céphalosporines peut être restaurée en présence de BRL4215 qui est un inhibiteur puissant des bêta-lactamases de classe C (**Ishii et al., 1995**).

6. *Klebsiella pneumoniae* :

Elle appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*. C'est bactérie commensale du tube digestif et des voies aériennes supérieures. Elle a une ONPG-positive, VP-positive donnant des colonies d'aspect muqueux. *K. pneumoniae* est fréquemment isolée de l'environnement (eaux usées, sol, etc...) et de la flore commensale des muqueuses et des voies respiratoires supérieures. Elle est bacille immobile, aéro-anaérobie, à Gram négatif, oxydase négatif, nitrate réductase positif et qui fermente le glucose, opportuniste impliqué dans des infections nosocomiales, généralement des infections urinaires, des pneumopathies et des septicémies (**weill et al., 2004**).

➤ **Résistance naturelle :**

K. pneumoniae est naturellement résistante aux pénicillines (amoxicilline, ticarcilline) par production d'une bêta-lactamase de classe A d'espèce (chromosomique) appelée K2, inhibée par l'acide clavulanique (exemple : *Klebsiella pneumoniae* 1189) (**Yigit et al., 2005**).

➤ Résistance acquise :

Résistance aux inhibiteurs des bêta-lactamases : des bêta-lactamases de classe A de type IRT insensibles à l'acide clavulanique (mutants d'enzymes TEM) ont été décrites.

Bêta-lactamases de classe A à spectre étendu (BLSE) : de nombreuses souches de *K. pneumoniae* sont productrices de BLSE. Pour la plupart d'entre elles, la production de BLSE se traduit par des images de synergie très caractéristiques entre les céphalosporines de troisième génération et l'acide clavulanique (disque d'augmentin ou de clavantin) (exemple, *K. pneumoniae* 1249). On peut noter que certaines BLSE sont caractérisées par une activité faible vis-à-vis des céphalosporines de troisième génération. Dans ce cas, le niveau de résistance est bas et les images de synergies sont plus discrètes (exemple, *K. pneumoniae* 1112). La diversité des bêta-lactamases à spectre étendu décrites dans *Klebsiella pneumoniae* est très grande. Des BLSE telles que TEM-3, TEM-10 (ou MGH-1), TEM-12 (ou YOU-2), TEM-24, TEM-26 (ou YOU-1) ont été décrites. De nombreux variants de type SHV sont également connus (SHV-4, SHV-5, SHV-6 ou SHV-8). Plus récemment, la BLSE TEM-52 a été caractérisée : elle présente une activité inhabituelle vis-à-vis du moxalactame, ainsi qu'une synergie entre cet antibiotique et le clavulanate.

Bêta-lactamases plasmidiques de classe C : chez *Klebsiella pneumoniae*, on connaît un grand nombre de bêta-lactamases plasmidiques de classe C qui dérivent des céphalosporinases chromosomiques. On peut citer FOX-1 et MOX-1 (homologues à AmpC de *P. aeruginosa*), et LAT-1 et CMY-2 (homologues à AmpC de *Citrobacter freundii*) (**Baratus et al.,2005**).

Résistance au céfépime et au ceftiprome : elle a été récemment décrite chez *K. pneumoniae* et semble liée à la combinaison de deux mécanismes : la production à haut niveau d'une BLSE SHV-5 et une diminution de la perméabilité de la membrane externe (**weill et al.,2005**).

➤ **Résistance à l'imipénème :**

Elle peut être due à l'association d'une imperméabilité de la membrane externe (perte d'une porine de 42 Kda) à une production à haut niveau d'une beta-lactamase plasmidique de classe C (ACT- 1, homologue à AmpC de *E. cloacae* et MIR-1). On a également décrit au Japon une souche de *K. pneumoniae* résistante à l'imipénème et à la ceftazidime et hébergeant le gène d'une métallo-beta-lactamase IMP sur une structure de type intégron (**Philippon et al., 2005**)

7. *Pseudomonas* :

Elle appartient à la Famille des *Pseudomonadaceae* qui comprend de nombreuses espèces (*Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*). Bacilles à Gram négatif ne fermentant pas le glucose (comme *Acinetobacter*), largement présent dans l'environnement (eau, sol, végétaux) (**Floret et al., 2009**). Elle pathogène opportuniste isolée essentiellement chez des patients présentant une immunodéficience locale ou générale (brulés, cancéreux, etc). *Pseudomonas aeruginosa* est très fréquemment impliquées dans les infections nosocomiales (infections pulmonaires, cutanées) (**Zhou et al., 1993**). *Pseudomonas aeruginosa* appartient au groupe des non fermentants. bactérie aérobie stricte, mobile, produisant de la pyocyanine, capable de se multiplier à 41C (contrairement à *P. fluorescens* et *P. putida*) (**Bernd et Rehm., 2008**).

➤ **Résistance naturelle :**

Pseudomonas est naturellement résistante à un grand nombre d'antibiotiques en raison (i) de la production d'une bêta-lactamase chromosomique inductible de classe C qui n'est pas inhibée par le clavulanate et qui hydrolyse préférentiellement les céphalosporines de première génération (**Arlehamn et al., 2011**) et (ii) d'une mauvaise perméabilité membranaire. Pour la famille des bêta-lactamines, les molécules qui restent actives sont la ticarcilline, la

pipéracilline, la cefsulodine, l'association ticarcilline + clavulanate, la ceftazidime, l'aztréonam et l'imipénème (exemple : *P. aeruginosa* 1746). *P. aeruginosa* est également généralement résistant à la kanamycine (Poirel et Nordmann, 2006).

➤ Résistance acquise :

La résistance aux bêta-lactamines chez *Pseudomonas* pose souvent de sérieux problèmes car elle entraîne souvent la résistance à la plupart des antibiotiques. Ce type de résistance est généralement lié à des mutations conduisant à une hyperexpression de la bêta-lactamase chromosomique de classe C (exemple, *P. aeruginosa* 2307) et à une diminution de la perméabilité membranaire (déficit de la porine D2 spécifiquement associée à la résistance à l'imipénème) (exemple, *P. aeruginosa* 1092). De nombreuses bêta-lactamases (Types TEM, OXA, PSE), conférant la résistance aux pénicillines, ont été identifiées chez *P. aeruginosa* (David et Livermore, 2002)

➤ Beta-lactamases de type BLSE :

La bêta-lactamase PER-1, qui confère un phénotype de résistance de type BLSE, a été décrite dans une souche clinique de *P. aeruginosa*. Plus récemment, des variants de type TEM (TEM-42) et SHV-2 ont également été caractérisés. De nombreux mutants d'oxacillinases (OXA-11, -13, -14, -15, -18 par ex), conférant un haut niveau de résistance aux céphalosporines de troisième génération et inhibés par le clavulanate, ont été décrits ces dernières années (Poirel et Nordmann, 2006).

➤ Résistance à l'imipénème :

Elle peut être non enzymatique. Elle résulte alors de la perte de la porine D2 qui entraîne une diminution spécifique de la perméabilité pour l'imipénème. La résistance ne s'exprime à haut niveau que si la perte de D2 est accompagnée d'une hyperproduction de la céphalosporinase

chromosomique. Elle peut être enzymatique. Elle est dans ce cas liée à la production de métallo-bêta-lactamases de classe B (enzymes à zinc) qui présentent généralement un large spectre de substrat incluant les céphalosporines de troisième génération (sauf l'aztréonam) et l'imipénème. Ces enzymes sont inhibées par l'EDTA. A l'heure actuelle, on les trouve en situation plasmidique, ce qui fait craindre leur dissémination dans un avenir proche (Philippon.,1989).

8. *Salmonella* :

Famille des *Enterobacteriaceae*. C'est une bactérie pathogène, à transmission oro-fécale, agents des fièvres typhoïde et paratyphoïde, et d'infections intestinales. Elle est bacille mobiles aéro-anaérobie, à Gram négatif, oxydase négatif, nitrate positif et qui fermente le glucose. Il est différent pour les salmonelles majeures (que l'on ne trouve que chez l'homme) et les salmonelles mineures (ubiquistes) (Allen et al., 2002).

Salmonella majeures : *Salmonella Typhi*, *S. Paratyphi*, respectivement responsables des fièvres typhoïdes et paratyphoïdiques. La transmission se fait par les selles des malades. Après infection, l'hémoculture se positive avant la coproculture (passage dans le sang, puis retour dans l'intestin grêle). *Salmonella* mineures : *Salmonella*, responsables de gastroentérites (bactéries entéropathogènes invasives). Ces germes sont portés par l'homme et l'animal. Les salmonelles mineures sont impliquées dans 30 à 60 % des infections alimentaires. Un manque d'hygiène est très souvent à l'origine de la transmission (Cartalli et al., 2002).

➤ Résistance acquise :

Mécanismes identiques à ceux décrits pour *E. coli*. bêta-lactamase de classe A haut niveau (pénicillinase) : Exemple : *Salmonella* 1409, *S. Typhi* 5886 (Lzumiya et al., 2005).

Résistance aux inhibiteurs des bêta-lactamases : l'hyperproduction de bêta-lactamase TEM a été décrite. Bêta-lactamases de classe A à spectre étendu (BLSE) : TEM-27, plasmidique et associée à un haut niveau de résistance à la ceftazidime et à l'aztréonam. PER-1, qui n'appartient pas à la famille des enzymes TEM/SHV et qui a été détectée lors d'une épidémie en Turquie. beta-lactamases plasmidiques de classe C (céphalosporinases) : CMY-2, plasmidique, homologue à AmpC de *C. freundii*. DHA-1, plasmidique et conférant la résistance aux céphalosporines et aux céphamycines (Sulh et al., 2005).

9. *Aeromonas hydrophila* :

Elle appartient à la famille des *Vibrionaceae* (*Aeromonadaceae*). Elle est bactérie à Gram négatif trouvée dans les eaux, le sol, les aliments. Elle est opportuniste : Infection des plaies, diarrhées aiguës, septicémies chez les immunodéficients (Lineaweaver et al., 1992).

➤ Résistance naturelle :

Chez *Aeromonas*, on observe généralement la production de trois bêta-lactamases chromosomiques co-inductibles : une céphalosporinase de classe C (AsbA1 chez *A. sobria*, homologue à AmpC de *P. aeruginosa*). une oxacillinase de classe D (AsbB1 chez *A. sobria*, inhibée par l'acide clavulanique et également appelée OXA-12) une imipénèmase de classe B : CphA chez *A. hydrophila* AsbM1 chez *A. sobria* (également appelée ImiS). Toutes les souches d'*Aeromonas* sont naturellement résistantes à l'ampicilline (mais naturellement sensibles à l'imipénème malgré la présence de l'imipénèmase) (Ankita et al., 2016)

➤ Résistance acquise :

Bêta-lactamases de classe A à spectre étendu (BLSE) : la bêta-lactamase TEM-12 a été identifiée dans une souche d'*Aeromonas caviae* sur un plasmide auto-transférable.

Curieusement, l'enzyme ne s'exprime pas chez *A. caviae* et sa détection n'a été possible qu'après transfert du plasmide dans une souche réceptrice de *E. coli* (Peatman et al., 2017).

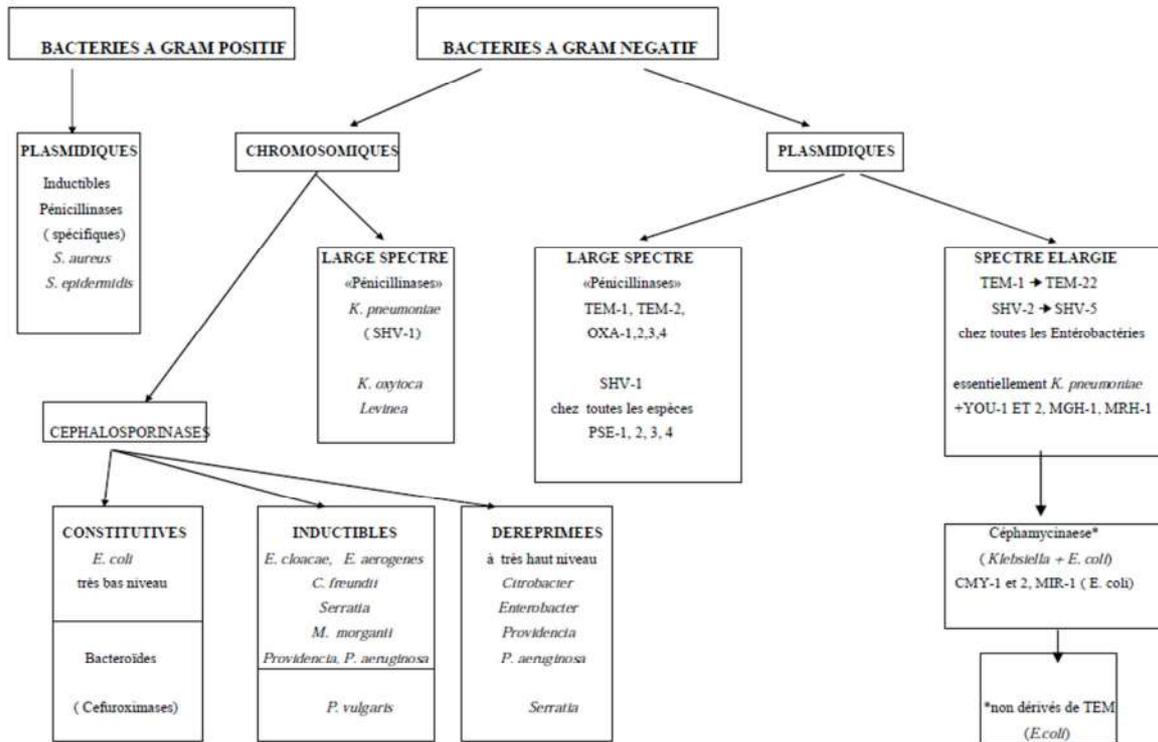


Figure 04 : Classification des bêta-lactamases (Peatman et al., 2017)

Chapitre III

Plante étudiée

(Olea europaea)

Chapitre III : plante étudiée (*Olea europaea*)

L'olivier est une espèce appartenant à la famille des Oléacées et au genre *Olea*. Ce genre regroupe une trentaine d'espèces et sous-espèces dont *Olea Europaea* (olivier méditerranéen) qui est la seule espèce cultivée. Il est multiplié essentiellement par voie végétative (bouturage ou greffage), alors que les formes sauvages se multiplient par voie sexuée (graines). Il est considéré comme une espèce caractéristique de la région méditerranéenne (**Qatibi et al., 2004**).

1. Classification botanique d'Oliver :

La classification botanique de l'olivier selon **Guignard (2004)**, est la suivante :

Règne: Végétal

Embranchement: Spermaphytes

Sous embranchement: Angiospermes

Classe: Dicotylédones

Sous classe: Astéridées

Ordre: Lamiales

Famille: Oléacées

Genre: Oléa

Espèce: *Oléa européa*

2. Caractères morphologiques d'olive:

L'olivier domestique est, du point de vue génétique, un arbre de taille moyenne qui, dans les cas extrêmes, peut atteindre une hauteur de 10 m. A l'état naturel, il présente une frondaison arrondie. L'olivier est un arbre polymorphe, qui présente une phase juvénile au cours de laquelle les feuilles sont différentes de celles de l'âge adulte. Ce polymorphisme n'est important que chez les arbres obtenus par semis, les arbres reproduits végétativement ne présentent pas une forme de feuille juvénile (**Tombesi et Cartechini, 1986**).

L'olivier s'adapte bien à des conditions d'environnement extrêmes telles que la sécheresse et la chaleur. Bien qu'il exige un sol léger et aéré pour un bon développement, l'olivier tolère un large éventail de types de sols différents et résiste à de faibles températures. L'olivier est un arbre à fructification bisannuelle dans toutes les conditions de croissance. Dans la plupart des cultivars, les fruits se trouvent à la surface de la frondaison (**Tombesi et Cartechini, 1986**).



Figure 05 : différents caractères botaniques de l'olivier (**Tombesi et Cartechini, 1986**).

3. Distribution géographique :

Bien que l'olivier soit présent dans les quatre continents, environ 98 % de la production mondiale d'olive provient du bassin méditerranéen (**Benhayoun et Lazzeri, 2007**). On le rencontre surtout entre le 25^{ème} et le 45^{ème} degré de latitude, dans l'hémisphère Nord aussi bien que Sud. Il est limité au Nord par les froids hivernaux et les fréquentes gelées printanières alors qu'au Sud par le climat aride et saharien (Figure 2). La culture de l'olivier a

été exportée dans plusieurs régions du monde comme l’Australie, la Chine, les Etats-Unis, l’Afrique du Sud, l’Argentine, ... Sa plasticité écologique, et son importance nutritionnelle et économique lui ont valu d’être cultivé sous diverse conditions pédoclimatiques très contractées. Cette espèce joue un rôle environnemental majeur, en particulier dans des terroirs marqués par de faibles pluviométries et/ou de fortes pentes (Qatibi et al., 2004).

Avec une superficie actuelle d’environ 9,6 millions d’hectares (FAO, 2012), l’olivier occupe le 24^{ème} rang parmi les 35 espèces les plus cultivées au monde. Elle est principalement située dans le bassin méditerranéen. Sa culture concerne plus de 7 millions de familles, soit 30 millions de personnes, et s’évalue à 7 milliards de Dollars (Nasles, 2006). 75% de terres cultivés sont réparties en petites superficies.

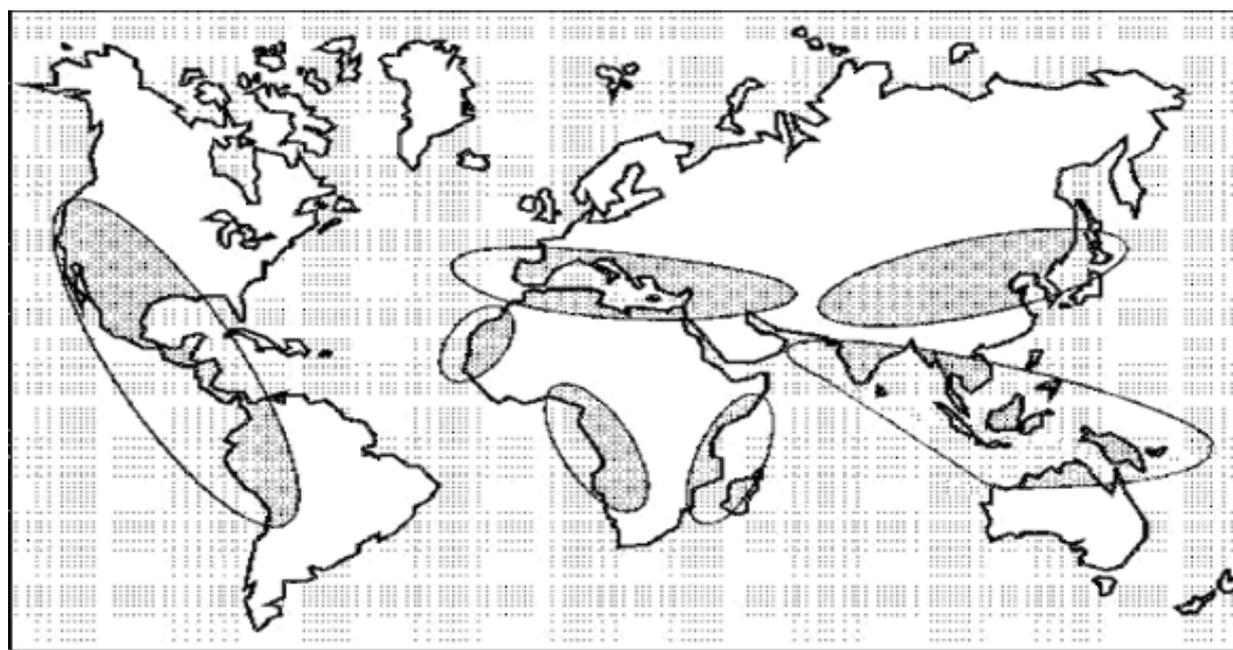


Figure 06: Carte de distribution du genre *Olea europaea* dans le monde (Nasles, 2006).

4. Feuilles d'olives :

Persistantes, opposées, coriaces, ovales oblongues, à entières et un peu enroulés, portées par un court pétiole; elles sont vert grisâtres, à vert sombre dessous blanchâtres et à une seule nervure dessous. Très souvent, elles contiennent des matières grasses, des cires, des chlorophylles, des acides (gallique et malique), des gommés et des fibres végétales **(Amouretti, 1985)**.

La feuille de l'olivier a son propre système de protection contre la chaleur de l'été. La face supérieure vert sombre exposée au soleil est recouverte d'une pellicule vernissée à travers laquelle l'eau peut s'échapper. L'évaporation se fait par l'autre face où se trouvent les stomates, organes constitués d'orifices microscopiques, qui composent l'épiderme de la feuille et les minuscules poils qui les recouvrent. Lorsque l'air est humide, les poils se soulèvent et libèrent de la vapeur d'eau. Lorsque l'air est sec, les poils se plaquent, bouchant l'ouverture des stomates, empêchant ainsi toute transpiration. Les feuilles présentent des bords révolutés, c'est-à-dire roulés en dehors et en dessous **(Jean Pagnol, 1985)**.

5. Valorisation :

La matière sèche des feuilles d'olive se situe autour de 50% à 58% ; celle des feuilles sèche autour de 90% .la teneur en matière azotée est totale (MAT) des feuilles varie de 9 à 13%.la solubilité de l'azote est faible (situé entre 8 et 14%) ; selon la proportion de bois. La teneur en matière grasse (MG) est supérieur à celle de fourrage et oscille autour de 5 à 7% mais celle des constituants pariétaux et en particulier de la lignine et constamment élevé (18 à 20%) **(Tisserand, 1991)**.

Tableau 02: composition chimique global des feuilles d'olivier (exprimé en g/100g) selon plusieurs auteurs.

Composition (en %)	Boudhrioua et al. ; 2009	Erbay et Icier ; 2009	Martin- Garcia et al. ;2006	Garcia- Gomez et al. ; 2003	Fegeros et al. ; 1995
Eau	46.2-49.7 f	49.8 f	41.4 f	//	44.0 f
Protéines	5.0-7.6 f	5.4 f	7.0 s	//	//
Lipides	1.0-1.3 f	6.5 f	3.2 s	6.2 s	//
Minéraux	2.8-4.4 f	3.6 f	16.2 s	26.6 s	9.2 s
Carbohydrates	37.1-42.5 f	27.5 f	//	//	//
Fibres brutes	//	7.0 f	//	//	18.0 s
Cellulose	//	//	//	19.3 s	11.4 s
Hémicellulose	//	//	//	25.4 s	13.3 s
Lignin	//	//	//	30.4 s	14.2 s
Polyphénols totaux	1.3-2.3 s	//	2.5 s	//	//
Tannins soluble	//	//	//	//	0.3 s
Tannins condenses	//	//	0.8 s	//	1.0 s

f : Correspond aux valeur exprimé par rapport à la masse fraîche des feuilles d'olivier.

s : Correspond aux valeur exprimé par rapport à la masse sèche des feuilles d'olivier.

// : Valeur non déterminée.

Tableau 03: composition en acides aminés des feuilles d'olivier fraîche (exprimé en g /kg d'azote total) selon **Martin et Molina (2008)**

Acide aminés	Concentration
Ac. Aspartique	27.5
Ac. Glutamique	35.1
Serine	44.5
Glycine	79.6
Histidine	25.4
Arginine	162.0
Threonine	46.8
Alanine	73.8
Proline	84.2
Tyrosine	32.3
Valine	74.8
Méthionine	5.3
Cysteine	1.6
Isoleucine	58.8
Leucine	73.8
Phenylalanine	51.8
Lysine	19.1
Ac. Aminés essentiels	547
Ac. Aminés non essentiels	379
Ac. Aminés totaux (sans tryptophane)	926

Tableau 04: composition en minéraux des feuilles d'olivier (exprimé en g/kg de matière sèche) selon **Fegeros et al. (1995)**

Minéraux	Concentration
Calcium (Ca)	12.7
Phosphore (p)	2.1
Manganese (Mn)	1.9
Potassium (k)	6.3
Fer (Fe)	273.0
Cuivre (Cu)	10.7
Zinc (Zn)	21.3
Magnesium (Mg)	50.0

6. Intérêts médicinal:

Depuis l'antiquité; les feuilles d'olivier sont employées en phytothérapie. A l'époque Grecque ; les feuilles ont été utilisées pour désinfecter les blessures cutanées. Les anciens leur attribuaient des vertus antiseptique et la propriété de combattre tout sortes d'infections. Au XIXème siècle ; on s'en servait pour combattre le paludisme (malaria). Ces usages sont tombés en désuétude pendant un certaine temps en raison de l'omniprésence des ATB. Cependant ; les professionnels modernes de la santé commencé à utiliser l'extrait de F.O ; en 1995 ; les premiers résultats furent très positif. Depuis ; il a été démontré que la F.O possède de nombreux avantage thérapeutique contre de nombreuses maladies et des vertus dans le maintien de la santé globale (**Aydogan, 2008**).

Par leur pouvoir antimicrobien en antiviral ; les feuilles peuvent être bénéfique dans le traitement des affections causées par ou associés à un virus ; un rétrovirus ; une bactérie ou un protozoaire. Parmi ces pathologies traitables il y a : la grippe, le rhume, les infections dues

aux candidoses, la tuberculose, la malaria, la diarrhée sévère, la fatigue chronique, la pneumonie, les infections des voies urinaires et les soins dentaires. Comme un antioxydant, l'extrait de feuilles protège les vaisseaux sanguins et améliorer la circulation sanguine. Il a été montré qu'il peut être efficace dans la protection du cœur lors d'une l'occlusion coronaire. Les feuilles ont été démontrées aussi possédant des propriétés anti-cancérigènes. Outre ; leur richesse en flavonoïdes leur attribue la propriété radio-protective (**Cherif, 1996**).

7. L'oleuropéine (OLP):

OLP, un composé secoiridoides, est présent dans l'ensemble des huiles d'olivier et ses produits dérivés (huile d'olive, margine et grignons). Il est le plus abondant bio-phénols et le composé bioactif majeur dans les feuilles d'olive (F.O.) plusieurs auteurs ont rapporté que les F.O sont source utile pour l'extraction de l'OLP, il possède de nombreux effets bénéfiques sur la santé humaine. Ainsi cette molécule est utilisée pour ces propriétés antioxydants (**Benavente-Garcia et al., 2000**), antimicrobienne, antiviraux (**Micol et al, 2005**), et anti-inflammations, en outre, l'OLP possède un effet cardioprotecteur, et neuroprotectrice, des études in vitro ont démontré que l'OLP agit comme un composé anti-tumoral, inhibe l'activité du facteur d'activation des plaquettes, et peut être un modulateur du métabolisme. Il améliore aussi le métabolisme des lipides pour se protéger contre les problèmes d'obésité. L'OLP intervient dans le développement du processus de l'auto-défense d'olivier contre l'attaque d'agent pathogènes et des insectes (**Malik et Bradford, 2006**)

8. Action antimicrobienne :

Un grand nombre de recherches confirment l'activité antimicrobienne de l'OLP. Il est actif in vitro contre un grand nombre de germes (*Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Hemophilus*, *Pseudomonas*...). Egalement actif dans certaines affections virales. Il joue aussi un rôle dans la régulation de la flore gastrique par la réduction sélective de *Helicobacter pylori*, cette

substance possède une forte activité antimicrobienne contre les bactéries gram négatives et les mycoplasmes (Mylonaki et al., 2008).

L'OLP et les produits de son hydrolyse sont capables d'inhiber le développement et la production de l'enterotoxine B par *Staphylococcus aureus*, le développement de *Salmonella enteritidis*, la germination et le développement des spores de *Bacillus cereus*. Il inhibe également le développement de *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, et *Bacillus creus* (Karsisiotis et al., 2013).

Deuxième partie

Expérimentation

Matériel et méthodes

Ce présent travail a été effectué au niveau du laboratoire de l'université Dr Molay Tahar de Saïda.

L'objectif de notre travail est visé en premier temps à rechercher des micro-organismes producteurs des métallo-béta-lactamases, qui présentent un niveau élevé de résistance aux antibiotiques qui se trouvent dans le milieu hospitalier afin :

- De vérifier le niveau d'hygiène atteint dans ces services.
- Confirmer la résistance aux antibiotiques.
- Détecter la production des métallo-béta-lactamases.

Dans un deuxième temps, une recherche des inhibiteurs naturels, à partir des extrait de feuilles d'olivier, des métallo-béta-lactamases a été effectuée par :

- Extraction spécifique des composés capable d'inhiber ces enzymes.
- Tester notre extrait sur l'enzyme responsable à la résistance

I. Extraction et phytochimie :

I.1. Matériel végétal :

Les feuilles d'olivier ont été récoltées fraîchement au mois d'Octobre (2017) au niveau de la région de Naama. L'identification botanique a été faite au niveau de Laboratoire de Biotoxicologie , Pharmacognosie et valorisation biologique des plantes; Faculté des Sciences de l'Université de Saida. Les feuilles sont triées, coupées et séchées à température ambiante et à l'abri du soleil pendant quelques semaines. La wilaya de Naâma est située entre l'Atlas tellien et l'Atlas saharien, à l'Ouest de l'Algérie, à plus de 1000 mètres d'altitude sur les hauts plateaux. Elle est voisine au Nord avec les wilayas de Tlemcen, Sidi-Bel-Abbès et Saïda, à l'Est celle d'El-Bayadh et au Sud celle de Béchar et à la frontière avec le Maroc à l'Ouest. Le

climat est semi-aride. Elle s'étend sur une superficie de 29950 km² pour une population estimée en 2008 à 209 470 habitants (ONS Algérie, 2008).

I.2. Préparation de l'extrait :

L'extraction a été effectuée pour obtenir des molécules potentiellement inhibitrices des métallo-béta-lactamases. En effet, les feuilles d'olivier (FO) sont broyées en fine poudre. L'extraction sous reflux en utilisant plusieurs solvants a été choisie pour cette étude, selon le protocole suivant :

L'extrait des FO est obtenu par un système Soxhlet. Nous avons introduit 10g de la poudre des FO dans un ballon à fond plat, cette quantité a été additionnée par 100 ml de l'éthanol à 80%, le tout a été porté à 80 c° pendant 3h. Puis, l'extrait obtenu a été filtré à travers un papier filtre Whatman. Nous avons récupéré le solvant organique par une évaporation sous vide, porté à une température de 60 C°, les résidus obtenus sont récupéré par l'eau distillée(Lee et al., 2009).

I.3. Calcul de rendement :

Le rendement est calculé par application de la formule suivante :

$R (\%) = 100 \times M_{\text{ext}}/M_{\text{éch}}$, où : **R** est le rendement en % ; **M_{ext}** est la masse en grammes au terme de l'extraction et **M_{éch}** est la masse sèche en grammes de l'échantillon. (**Karumi et al, 2004**)



Figure 07 : les FO séchées (à gauche) et les FO en poudre (à droite).



Figure 08 :Montage d'extraction des F.O par Soxhlet (à gauche), filtration de l'extrait (au milieu),et l'évaporation sous vide par rotavapor de type Heidolph (à droite).

I.4. Extraction liquide-liquide :

L'extraction liquide-liquide est une méthode de purification basée sur la différence de solubilité d'un soluté dans deux phases non miscibles. En chimie organique, on utilise habituellement une phase aqueuse et une phase organique. L'extraction consiste à faire passer un produit d'un solvant dont il est difficile à séparer (eau) à un autre solvant dont il sera facilement isolable (solvant organique). Les procédures de cette extraction ont été proposées par **Lee et al. (2009)** comme le suivant :

- 1- Nous avons introduit la solution à extraire et 13.44 ml d'hexane dans l'ampoule à l'aide d'un entonnoir à liquide.
- 2- Après avoir bouché l'ampoule, on la tient retournée ; à deux mains, et on agite énergiquement. Pour extraire le soluté de façon optimale, il faut atteindre l'équilibre de partage précédent. Or si on laisse le contenu de l'ampoule sans agitation, l'interface entre les deux phases est très faible et la diffusion du soluté d'une phase vers l'autre est lente. L'agitation énergique de l'ampoule permet d'augmenter cette interface et d'atteindre l'équilibre plus rapidement.
- 3- Il faut déboucher l'ampoule lorsqu'on la repose sur son support, toujours pour éviter une surpression. On doit ensuite laisser décanter les phases.
- 4- Nous avons récupéré ensuite les deux phases séparément : la phase aqueuse est en générale plus dense que les phases organiques,
- 5- Finalement, nous avons introduit la solution obtenue de la phase aqueuse et fait la même méthode une fois avec 13.44ml de Chloroforme, autre fois avec 13.44ml d'Acétate d'éthyle et en dernier avec 13.44 ml de Butanol. A la fin nous obtenent l'extrait brut (**Boizot et charpentier, 2006**).

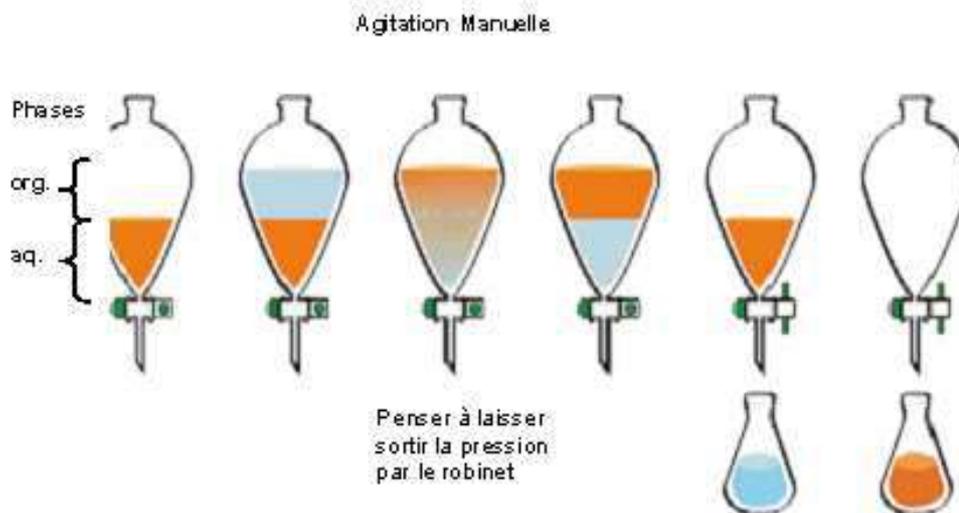


Figure 09: principe de la décantation



Figure 10 : ampoule à décanter contient l'extrait et le solvant organique (hexane), (à gauche), les différentes phases (phase organique et phase aqueuse), (à droite).



Figure 11 : l'extrait et le chloroforme (à gauche), l'extrait l'Acétate d'éthyle (au milieu), l'extrait et Butanol (à droite)

I.5. Dosage des flavonoïdes :

Les réactifs utilisés sont les solutions incolores de nitrite de sodium (NaNO_2) et de chlorure d'aluminium (AlCl_3). Le principe de la méthode est basé sur l'oxydation des flavonoïdes par ces réactifs. Elle entraîne la formation d'un complexe rose qui absorbe à 510 nm. La comparaison de la D.O observée par rapport à celle obtenue par un étalon de catéchine de concentration connue permet d'évaluer la teneur totale en flavonoïdes (Flv). La quantification des flavonoïdes est faite selon une méthode spectrophotométrique décrite par (**Dewanto et al., 2002**). Une prise de 250 μl d'extrait diluée est additionnée de 75 μl d'une solution de NaNO_2 à 7%. Après 6 min d'incubation à température ambiante, 150 μl d'une solution fraîchement préparée d' AlCl_3 à 10% sont ajoutés au mélange. Après 5 min de repos à température ambiante, 500 μl de soude (NaOH , 1M) sont apportés au mélange, le volume final est porté à 2500 μl avec de l'eau distillée. L'absorbance de cette préparation est mesurée à 510 nm. Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en

utilisant la catéchine à des concentrations de 0 à 400 µg/ml. Les teneurs en flavonoïdes sont exprimées en milligramme équivalent catéchine par gramme de la matière végétale sèche (mg EC.g-1 MS) (Zhishen et al., 1999).

II. Screening des souches potentiellement sécrétrices des MBL:

II.1. Prélèvement :

Toutes les souches sont prélevées à partir de l'hôpital de Mècheria (Naama). Les prélèvements ont été effectués, par écouvillonnage à partir de salle de soin (table de soin, lai, les coins de salle de soin) et de salle de dentiste (la chaise dentaire, touillons de la chaise dentaire, lave main de dentiste, les coins de salle de dentiste), puis ces prélèvements ont été acheminés au laboratoire dans des tubes de bouillon nutritif pour être incubés à 37°C pendant 24h. Le recueil des souches a été effectué entre Octobre 2017 et Février 2018.

II.2. Isolement :

L'ensemencement des souches a été réalisé sur plusieurs milieux de culture dont : la gélose nutritive, MacConkey (Mc), King A, King B, et le milieu Cétrimide. L'incubation a été effectuée à 37°C pendant 24h.

II.3. Détection phénotypique de métallo-bêta-lactamases par le test CDT :

La recherche des métallo-bêta-lactamases (MBL) a été effectuée sur des souches résistantes à l'IMP en mettant à profit de l'éthylène-diamine-tétra-acide (EDTA). Les MBLs sont des carbapénémases qui nécessitent un ou deux ions de Zinc pour leur fonctionnement catalytique d'où l'inhibition de celui-ci par l'EDTA (chélateur des cations divalents) ; cette propriété est mise en profit dans des tests synergie (Aggoune-Khinache et al., 2009).

A partir des cultures jeunes sur les géloses king A, kin B, Cétrimide et Mc. Nous avons sélectionné des bactéries bien isolées et identiques dans 2ml de milieu liquide (bouillon nutritif), ces inoculums sont incubés sous agitation à 37 °C pendant 6h. Après, nous avons les ensemencé sur milieu GN, et les incubé à 37 °C pendant 24h (**Mona et al.,2005**).

A partir des cultures jeunes sur la gélose GN, nous avons prélevé cinq colonies bien isolées et identique dans 5 ml de l'eau physiologie stérile. Après une homogénéisation manuelle, nous avons ajusté la charge bactérienne à 10^8 ufc/ml à l'aide d'un spectrophotomètre réglé à une longueur d'onde de 625nm.Selon la standardisation de Mc Farland, nous admettons une DO comprise entre 0.08 et 0.1. Par la suite et après dilution de $1/100^{\text{ème}}$, des surfaces entières de la gélose Muller Hinton préalablement coulé dans des boites de pétri ont été ensemencées par cette suspension microbienne par la technique d'écouvillonnage (**Mona et al., 2005**)

Dans la même boite de gélose ensemencée, Nous avons déposé deux disques contenant chacun 10µl d'imipenème par une distance entre eux de quatre centimètres. Nous avons rajoute à l'un d'eux 10µl d'EDTA. Les boites sont incubées à 37 °C pendant 24 h, et les diamètres des zones d'inhibition sont notés en millimètre (mm) (**Mona et al., 2005**).

II.4. Identification:

Les souches, qui ont révélé une propriété sécrétrice des MBL, ont été identifiées. L'identification préliminaire est basée sur leurs caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques (coloration de Gram, catalase, TSI, galerie API...).

II.4.1. Examen microscopique :

Observation à l'état frais :

Ce test permet de déterminer la forme, l'arrangement et la mobilité des bactéries, il consiste en l'observation d'une goutte sa suspension bactérienne, préparé avec l'eau physiologique et placée entre lame et lamelle. L'observation se fait sur microscope photonique au grossissement x40 et fois x100. (Huss et al., 1999)

Coloration de Gram :

C'est une coloration qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne, et d'utiliser ces propriétés pour distinguer et classer les bactéries. Nous avons réalisé un frottis sur une lame de microscope à partir d'une suspension bactérienne. Ensuite, nous avons déposé ce prélèvement au milieu de la lame en faisant des rotations jusqu'à séchage. La fixation du frottis a été réalisé avec de l'éthanol à 90° (pendant 5 minutes) puis nous avons enflammé la lame 3 fois à l'aide du bec Bunsen. La coloration au violet de Gentiane (colorant basique) a été effectuée en plongeant la lame pendant 2 à 3 minutes (en fonction de la concentration) dans la coloration au violet de gentiane. Toutes les bactéries sont colorées en violet puis rincer à l'eau déminéralisée. Pour le mordantage au lugol (solution iodo-iodurée), nous avons étalé le lugol et laisser agir durant 20 secondes suivie par un rinçage par l'eau déminéralisée. Cette étape permet de stabiliser la coloration violette. La décoloration à l'alcool a été réalisée par un versement goutte à goutte l'alcool sur la lame inclinée obliquement. Les lames ont été surveillées pendant 5 à 10 secondes. Le filet doit être clair à la fin de la décoloration après un rinçage par l'eau déminéralisée. Finalement, nous avons contrôlé les colorations effectuées avec de la Fuchsine ou de la Safranine, **en** laissant agir de 30 secondes

à 1 minute suivi par un lavage doux par l'eau déminéralisée. Un séchage des lames sur une platine chauffante a été accompli à 40°C, 10 à 15 minutes (**David et al., 1994**)

II.4.2. Tests biochimiques :

L'identification biochimique est un examen qui permet d'identifier une bactérie en s'appuyant sur ces caractères biochimiques.

Recherche de la catalase :

Le test de la catalase permet de vérifier si une bactérie possède l'enzyme de la catalase ayant comme utilité de décomposer le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en eau (H₂O) ainsi qu'en oxygène (O₂) par la réaction suivant :
$$\text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{H}_2\text{O} + \frac{1}{2} \text{O}_2$$

La bactérie qui présente cette caractéristique peut ainsi se protéger du peroxyde d'hydrogène qui est habituellement toxique pour les bactéries aérobies, c'est-à-dire celles qui ont besoin d'oxygène pour proliférer. Bref, nous avons déposé une goutte d'eau oxygénée sur une lame. Al'aide de l'anse de platine ou d'une pipette Pasteur boullée, une colonie isolée (ou plusieurs si petites colonies) de la souche à tester a été déposé sur la goutte d'eau oxygénée. L'apparition des bulles d'air indique la catalase positive (**Saginur et al., 1992**).

Utilisation des sucres TSI (Triple SugarIron) :

Basée sur la production de sulfure d'hydrogène (H₂S), et la fermentation du glucose (avec présence ou sans dégagement de gaz), du lactose et du saccharose. C'est un milieu incliné dont le glucose présent dans le culot et la présence de lactose et le saccharose sur pente. L'ensemencement est réalisé par piqure centrale dans le culot puis par stries sur la pente, la lecture se fait après 24h d'incubation à 37 °C. La gélose TSI fournit quatre renseignements principaux :

(1) Pour la fermentation de glucose : si le culot est rouge, le glucose n'est pas fermenté, en revanche si le culot est jaune, le glucose est fermenté.

(2) Pour la fermentation du lactose et/ou du saccharose : si la pente inclinée est rouge, le lactose et saccharose ne sont pas fermentés. Si la pente inclinée est jaune signifie que le lactose et/ou saccharose sont fermenté(s).

(3) La production de gaz est révélé par l'apparition de gaz dans le culot.

(4) Pour la formation d' H_2S , il est remarqué une apparition d'une coloration noire entre le culot et la pente ou le long de la piqûre (Arnould et al., 2002).

Galerie API (Analytical Profile Index) :

La galerie API est un ensemble de petits tubes prêts à l'emploi permettant l'identification de micro-organisme par la réalisation rapide et facile de tests biochimiques miniaturisés.

La préparation de la galerie consiste à réunir le fond et la couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 mL d'eau dans les alvéoles (avec pipette graduée et pipeteur) pour créer une atmosphère humide. Inscrire les références de la souche bactérienne sur la languette latérale de la boîte (+ date et initiales de l'opérateur). Déposer la galerie dans la boîte d'incubation.

La préparation d'inoculum a été effectuée après de sélectionner des colonies bien isolées et la mettre en suspension dans une 5 ml d'eau distillée dans un tube à vice stérile. Pour l'inoculation de la galerie, nous avons rempli les tubes et les cupules de test (CIT, VP et GEL) par la suspension bactérienne. Nous avons rempli uniquement les tubes (et non les cupules) des autres tests. Une anaérobiose dans les tests ADH, LCD, ODC, URE, H_2S en remplissant leur cupule d'huile de paraffine a été créé. Les boites sont refermées et incubées dans l'étuve à 35 - 37° C pendant 18 à 24 heures (Guérin-Faubleé et al., 1992).

Après 24h d'incubation à 37°C, les cupules dans lesquelles on doit rajouter des réactifs :

-test TDA : quelque goutte de TDA.

-test VP : goutte de VP1 et VP2.

-test IND : quelque goutte de COVAX.

La lecture a été réalisée après 10 min pour toutes les réactions en se référant au tableau de lecture.

III. Essais d'inhibition de l'activité enzymatique par l'extrait des feuilles d'olivier

III.1. Mise en évidence d'un éventuel effet inhibiteur

III.1.1. Méthode de diffusion des disques :

Nous avons utilisé la méthode de diffusion des disques des antibiotiques sur gélose. A partir d'une préculture jeune sur gélose nutritive, nous avons prélevé quelques colonies que nous avons resuspendues dans 5 ml de bouillon nutritif. L'inoculum est ajusté à 10^8 cellules/ml (une DO de 0.08 à 0.1) par lecture de la densité optique à une longueur d'onde de 625 nm. La concentration cellulaire finale, fixée à 10^6 cellules/ml, est obtenue par dilution de l'inoculum initial à $1/100^{\text{ème}}$ dans de l'eau physiologique (0,9% de NaCl) (**CLSI-M2-A9 2006**).

Les boîtes de Pétri contenant de la gélose Mueller Hinton (pH de 7,2 à 7,4) sontensemencées aseptiquement par écouvillonnage. Ensuite elles sont séchées à proximité de la flamme. Les disques sont placés sur la gélose préalablementensemencée par les bactéries à tester. Les disques sont préparés en extemporané. Les boîtes ainsi préparées sont préincubées pendant 15 minutes à température ambiante avant d'être placées dans une étuve à 37°C pendant 18 à 24

heures. La lecture se fait par mesure des diamètres des zones d'inhibition autour du disque (CLSI-M2-A9 2006).

Dans la première, nous avons déposé deux disques contenant chacun 10µl d'imipenème et 10µl d'EDTA. Dans la deuxième boîte, nous avons déposé deux disques contenant chacun 10µl d'imipenème et 10µl de l'extrait des feuilles d'olivier (des disques de 6 mm de diamètre préparés à base de papier filtre (Whatman No.1), puis stérilisés par autoclavage) (CLSI-M2-A9 2006).

III.1.2. Détermination de la CMI par la méthode de microdilution :

Ce test en milieu liquide a pour objectif de déterminer la valeur de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) par la méthode des micro-dilutions sur milieu liquide. La technique utilisée a été décrite par CLSI en 2006. Elle est basée sur la capacité des microorganismes à produire une croissance visible à l'œil nu au sein d'une série de dilutions de la substance antimicrobienne (CLSI-M7-A7 2006). Le Bouillon Mueller Hinton (MH) (pH de 7,2 à 7,4) est largement utilisé comme milieu standard pour la micro-dilution en plaque. Il permet une meilleure croissance de la plupart des bactéries pathogènes non exigeantes, en plus de son faible effet antagoniste vis-à-vis des antibiotiques. Ce bouillon est considéré comme milieu de référence. A partir d'une pré-culture bactérienne en milieu solide (gélose nutritive) de 24 h à 37°C, nous avons prélevé quelques colonies à l'aide d'une anse de platine que nous avons resuspendues dans du bouillon nutritif. La concentration cellulaire est 10^8 cellules/ ml. Une dilution au 1/100^{ème} est effectuée pour avoir un inoculum final de 10^6 cellules/ ml.

Pour chaque ligne de la microplaque, nous avons déposés 50µl de l'inoculum dans les 12 puits à l'exception du puits N°12 qui servira de puits de contrôle de contamination, qui contient seulement le Bouillon Mueller Hinton, comme témoin positif (100 µl). Nous avons

ensuite ajouté 50 µl de la solution de l'extrait des feuilles d'olivier dans les 12 puits à l'exception du puits N°11 et puits N°12. Le puits N°11 servira de témoin négatif (croissance sans extrait). Les plaques sont scellées et placées dans une étuve à 35°C pendant 24 heures. La lecture du résultat s'effectue à l'œil nu à l'aide de d'une source de lumière sous la microplaque pour visualisé si il y'a une inhibition ou non (la croissance sous forme une troube). [(Espinel-Ingroff et Canton, 2007) ; (Majoroset al., 2005)].

La plus faible concentration de chaque fraction ne montrant aucune croissance sera considérée comme la concentration minimale inhibitrice (CMI), elle est confirmée par un ensemencement sur milieu solide (CLSI-M7-A7 2006).

III.2. Mise en évidence du type d'inhibition

III.2.1. Semi-purification des métallo-bêta-lactamases :

L'extrait semi purifié de métallo-bêta-lactamase a été préparé à partir de la souche qui montre des résultats positifs par le test CDT qui représente la souche productrice de la MBL.

En pratique, (28g) de Miller Hilton sont ragoutés progressivement à un volume suffisant d'eau distillée pour (2.5 L). Après la stérilisation (autoclave), nous avons réparti le bouillon obtenu sur des erlenmeyers de 1 L de volume à raison de 100 ml pour chacun. Ensuite, la souche étudiée a été inoculée puis incubée à 37 °C pendant 18h sous agitation.

L'inoculum obtenu est répartie sur six (6) erlenmeyers de 1 L de volume à raison de 10 ml d'inoculum, 400 ml de Miller Hinton bouillon, 100 µl de ZnSO₄ et 40µl de ceftazidine puis incubées à 37c° pendant 18h sous agitation.

Le milieu de culture est centrifugé à 4000tr/min pendant 10 min, le surnageant est rejeté. Le culot cellulaire a été lavé deux fois par la solution tampon phosphate PBS (phosphate buffered saline).

La lyse cellulaire a été réalisée par double choc l'un osmotique et l'autre thermique au même temps. Concernant le choc osmotique en utilisant (12.63 ml) de solution tampon Tris-Hcl. le choc thermique par refroidissement rapide dans l'eau congelée pendant 15 min et incubation pendant 10 min, cette dernière étape est répétée 3 fois successivement où les homogénats obtenus sont centrifugés à 10000 g pendant 40 min.

La précipitation des enzymes a été effectuée par l'agitation du surnageant obtenu pendant 30 min et puis par l'ajout de 152.60 g de sulfate d'ammonium et lisser 30 min pour l'homogénéisation pour atteindre une saturation de 80%, le mélange est centrifugé à 8000 tr/min pendant 30 min.

Les culots récupéré dans 50 ml du tampon Tris-Hcl, et ensuite dialysé contre le tampon Tris-Hcl pendant 12h et cette dernière étape est répétée 3 fois. Le dialysat, constitue notre extrait semi-purifié de bêta-lactamase dont il réparti dans des tubes eppendorf, puis conservé à 20c° jusqu'à l'utilisation.



Figure 12 : Ultracentrifugeuse

III.2.2. Dosage des protéines (méthode de Bradford) :

Le dosage de protéine est réalisé selon la méthode de Bradford (1976) améliorée par (**Macart et Gerbaut (1982)**) dont le principe est : en présence du réactif de bleu de Coomassie, les résidus d'acide aminés basiques (arginine, histidine,...) et hydrophobes (leucine, alanine,...) des protéines forment avec ce pigment en milieu acide un complexe qui absorbe à 595 nm, proportionnellement à la quantité de protéines existante.

A des concentrations finales croissantes d'albumine sérique bovine (2 mg/ml) et à des volumes appropriés d'extraits de bêta-lactamases semi-purifiés, est rajouté à chacune 5 ml de bleu brillant de Coomassie G 250, Après agitation et incubation pendant 10 min à l'obscurité et à température ambiante, les absorbances des mélanges sont déterminées à 595 nm.

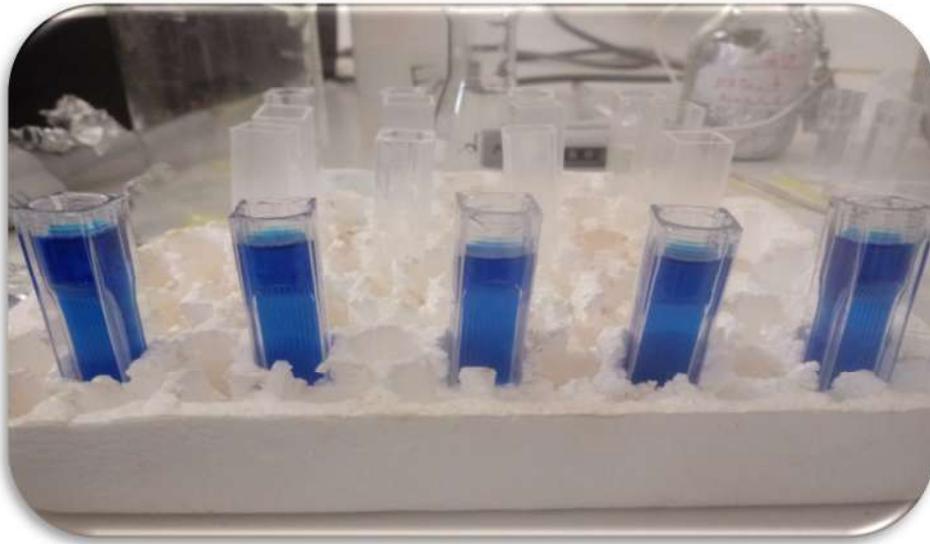


Figure 13 : Cuves remplies pour le dosage de protéine

III.2.3. Séparation électro-phorétique :

Dans des tubes d'Eppendorf, nous avons versé 75 μ l d'extrait semi-purifié de l'enzyme. Ensuite, nous avons ajouté 25 μ l de la solution tampon. Le mélange est porté à un chauffage à 95 °C pendant 10 min et puis centrifugé à 6000 tr/min pendant 10 min. Le surnageant a été versé dans les puits. Après une heure de migration sous agitation, la décoloration est réalisée à l'aide d'une solution décolorante (Mofadde et al., 1999).

III.2.4. Cinétique enzymatiques :

L'objectif de ces essais est la mise en évidence d'un éventuel effet d'inhibition de l'extrait des feuilles d'*Olea europaea* qui s'avèrent douer d'effet inhibiteur de l'activité enzymatique d'extrait semi purifiés de bêta-lactamases (Jeanjean-Paolucci et al., 2000). Ce test nécessite tout d'abord Pénicilline G, Ampicilline, Ceftriaxone comme substrats (ATB); sous forme de solution diluée par eau physiologie. En pratique, à des volumes suffisant pour 1300 μ l de solution (ATB+ ZnSo₄ + eau physiologie...), nous avons ajouté 20 μ l d'enzyme semi purifiée.

En présence de l'inhibiteur (extrait des feuilles d'olivier) et à des volumes suffisant pour 1300 μ l de solution (ATB+ ZnSo₄+ eau physiologie...), nous avons ajouté des différentes concentrations de l'extrait d'olivier (par des volumes de l'ordre de 20 μ l, 100 μ l, 200 μ l, 400 μ l). Après homogénéisation manuelle, l'évolution de l'absorbance des milieux réactionnels est suivie à température ambiante et à 235nm pour AMP, Pénicilline et 260nm pour Cft (spectrophotometrie).

Les vitesses initiales de réaction sont à chaque fois notées en $\Delta A/\text{min}$ puis converties en $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$. Les valeurs des constantes de Michaelis (KM) et des vitesses maximales (V_m ou Activité spécifique) respectifs sont déterminés à partir des courbes de Lineweaver et Burk tracées en fonction de l'inverse des concentrations des différents substrats et l'inverse des vitesses relatives grâce au logiciel « SIGMAPLOT 12.0 » auquel le module de pharmacologie « Enzyme Kinetics 1.3 » a été ajouté.