

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة سعيدة مولاي الطاهر

Université Saïda MOULAY Tahar



كلية العلوم

Faculté des Sciences

قسم البيولوجيا

Département de Biologie

N° d'Ordre

**Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master**

En Sciences biologiques

**Spécialité : Biochimie**

Thème

**Contribution à l'étude de l'inhibition de l'activité enzymatique relative  
des Métallo-Bêta-Lactamases par des extraits et des huiles essentielles  
de *Syzygium aromaticum* et d'*Eucalyptus globulus***

Présenté par :

- Melle: CHABANE CHAOUCH Samia

Soutenu le :02/07/2022

Devant le jury composé de :

Président	Mm. HADJADJ Hassina	MCA	Université de Saïda
Examineur	Mr. BEROUKECH Abdelkrim	Professeur	Université de Saïda
Encadrant	Mr. HALLA Noureddine	MCA	Université de Saïda

**Année universitaire 2021/2022**



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة سعيدة مولاي الطاهر

Université Saïda MOULAY Tahara



N° d'Ordre

كلية العلوم

Faculté des Sciences

قسم البيولوجيا

Département de Biologie

**Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master**

En Sciences biologiques

**Spécialité : Biochimie**

Thème

**Contribution à l'étude de l'inhibition de l'activité enzymatique relative  
des Métallo-Bêta-Lactamases par des extraits et des huiles essentielles  
de *Syzygium aromaticum* et d'*Eucalyptus globulus***

Présenté par :

- Melle: CHABANE CHAOUCH Samia

Soutenu le :02/07/2022

Devant le jury composé de :

Président	Mm. HADJADJ Hassina	MCA	Université de Saïda
Examineur	Mr. BEROUKECH Abdelkrim	Professeur	Université de Saïda
Encadrant	Mr. HALLA Noureddine	MCA	Université de Saïda

Année universitaire 2021/2022

## Dédicaces

*Je dédie cette mémoire*

*Aux êtres les plus chers : Mes parents A mon père,*

*Mon plus haut exemple et mon modèle de persévérance pour aller Toujours de l'avant  
Pour son*

*Enseignement continu à m'inculquer les vraies valeurs de la vie et Pour ses précieux  
conseils.*

*J'espère que cette mémoire sera à la hauteur de tes attentes et qu'elle Soit  
l'accomplissement de tous tes efforts.*

*A ma mère, Pour son affection, sa patience, sa compréhension, sa*

*Disponibilité, son écoute permanente et son soutien sans égal dans*

*Les moments les plus difficiles de ma vie.*

*Là où je suis arrivée aujourd'hui c'est à vous*

*A mon grand-père le bonheur de mon enfance, ma grand-mère Mes oncles et tantes*

*A ma grande famille OHLABANE OHLAOUF*

*A mes chers frères*

*A mon fiancé et sa famille*

*A monsieur Benmahammed hadj et Monsieur Ahmed chef de laboratoire  
pédagogique Mes amis et collègues*

---

---

## Remerciements

*Avant tout, louange à dieu le tout puissant pour nous avoir donné le courage, j'adresse mes sincères remerciements à*

*MR. HALLA Noureddine qui, par sa grande compétence scientifique, ses précieuses conseils et son implication assidue nous a aidé et soutenu tout au long de ce travail de recherche. Nous le remercions très sincèrement pour son immense disponibilité, son dynamisme et son écoute constante, attentive et constructive. Je suis très honoré par son accompagnement et son aide. Pour tout cela, je tiens à lui exprimer toute ma gratitude.*

*Je remercie également les membres de jury, Dr : BEROUKEH Abdelkrim président de jury et M. HADJAJ Hassina pour l'acceptation d'examiner ce mémoire*

*Je tiens également à remercier à tous mes professeurs*

*Je tenu à remercier nos professeurs de la Faculté des Sciences département de biologie université de Gaida*

*De nous avoir toujours soutenue et encouragée durant toutes ces années. Nos remerciements s'adressent également à Monsieur Ahmed membre du le laboratoire pédagogique au département de biologie à la faculté des sciences de l'université Dr. Moulay Tahar de Gaida.*

### Liste des abréviations

- AIM:** AdelaideMipenmase  
**Asn:** Asparagine  
**BC I:** Bacilluscereus type I  
**BC II:** Bacilluscereus type II  
**B1:** B-lactamase classe B1  
**B2:** B-lactamase classe B2  
**MBL:** Métallo-Beta-Lactamase  
**CDT:** Combined Disc Test  
**CphA:** Cephalosporinase  
**DIM:** DutchMipenemase  
**EDTA:** Acide Ethylène DiamineTétraacétique  
**E. E:** Extrait éthanolique  
**FEZ:** FluoribacterEndogenous Zinc beta-lactamase  
**IMP:** IMiPénème  
**NDM:** New Delhi Métallo-Bêta-Lactamase  
**SBL:** SerineBêta-Lactamase  
**SFB:** ShewanellaFrigidimarinaclasse B  
**Sfh:** Serratiafonticolacarbapenem hydrolase  
**SIM:** SeoulMipénémase  
**SPM:** Sao PauloMetallo-enzyme  
**TMB:** TripoliMétallo-Bêta-Lactamase  
**VIM:** VéronaIntegro-encodedMétallo-Bêta- Lactamase

---

**Liste des tableaux**

<b>Tableau 1:</b> les résidus d'acides aminés du site actif des trois sous-classes MBLs coordonnés avec lesions du zinc .....	22
<b>Tableau 2:</b> Composition chimique de l'huile essentielle des clous de girofle.....	32
<b>Tableau 3:</b> Composition chimique de l'essence d'Eucalyptus globulus de plusieurs pays.....	40
<b>Tableau 4:</b> Activité antibactérienne de l'essence aromatique des espèces du genre Eucalyptus globulus déterminée in vitro par la méthode de diffusion en milieu gélosé(aromatogramme...)	41
<b>Tableau 5:</b> Représente les différentes rendements des extraits et huile essentielle de Eucalyptus globulus .....	70
<b>Tableau 6:</b> Représente les différentes rendements des extraits et huile essentielle de Syzygium aromaticum.....	70
<b>Tableau 7:</b> L'aspect physique et la couleur des extraits et huile essentielle d'syzygium aromaticum .....	91
<b>Tableau 8:</b> L'aspect physique et la couleur des extraits et huile essentielle d'syzygium aromaticum.....	92
<b>Tableau 9:</b> Résultats du screening phytochimique d'eucalyptus globulus .....	73
<b>Tableau 10:</b> Résultats du screening phytochimique d'syzygium aromaticum .....	73
<b>Tableau 11:</b> Résultats d'identification macroscopique et microscopique des souches utilisées .....	76
<b>Tableau 12:</b> Diamètres d'inhibition des différentes souches testées par Antibiotique Imipénem et la Synergie entre Imipénem les huiles essentielles et les extraits de Syzygium aromaticum et l'Eucalyptus globulus par la méthode de diffusion des disques.....	79
<b>Tableau 13:</b> Diamètres d'inhibition des différentes souches testées par les huiles essentielles et les extraits de Syzygium aromaticum et l'Eucalyptus globulus par la méthode de diffusion des disques.....	79
<b>Tableau 14:</b> Diamètres d'inhibition des différentes souches testées par les huiles essentielles et les extraits de Syzygium aromaticum et Imipénem par la méthode de diffusion des disques .....	81
<b>Tableau 15:</b> Concentrations minimales inhibitrices de antibiotique imipénem .....	82
<b>Tableau 16:</b> Concentrations minimales inhibitrices de huile essentielle de Syzygium aromaticum.....	82
<b>Tableau 17:</b> Concentrations minimales inhibitrices de l'extrait éthanolique de Syzygium aromaticum .....	82

## Liste des figures

<b>Figure 1:</b> Cycle b-lactame .....	5
<b>Figure 2:</b> Structures chimiques des principaux noyaux des b-lactamines.....	6
<b>Figure 3:</b> Échafaudage général des antibiotiques $\beta$ -lactamines cliniques avec leur numérotation atomique respective Le cycle $\beta$ -lactame est représenté en rouge.....	7
<b>Figure 4:</b> Réaction de transpeptidation catalysée par la transpeptidase.....	7
<b>Figure 5:</b> Blocage de la réaction de transpeptidation par une $\beta$ -lactame. ....	8
<b>Figure 6:</b> Mécanisme proposé pour l'hydrolyse des carbapénèmes par une b-lactamase (noyau b-lactame en rouge et molécule d'eau en bleu).....	9
<b>Figure 7:</b> Hydrolyse des antibiotiques $\beta$ -lactamines par l'enzyme de $\beta$ -lactamase.....	10
<b>Figure 8:</b> Mécanisme de réaction des sérine- $\beta$ -lactamases (SBL) et des MBL. Mécanismes réactionnels généraux pour l'hydrolyse des céphalosporines par (a) les SBL et (b) les MBL...	11
<b>Figure 9:</b> Schémas de classification des $\beta$ -lactamases des bactéries.....	12
<b>Figure 10:</b> Structures représentatives des trois sous-classes de métallo- $\beta$ -lactamases (MBL): B1 NDM-1 (PDB 3spu), B2 Sfh-I (PDB 3sd9) et B3 L1 (PDB 1sml). ....	18
<b>Figure 11:</b> Structure tétramérique d'une MBL de enrubans. Les ions zinc sont présentés comme des sphères grises. Les ions zinc sont présentés comme des sphères grises .....	20
<b>Figure 12:(A):</b> La structure reconstituée d'une métallo-bêta-lactamase de la sous-classe B1, forme Mononucléaire (Bacillus cereus II); (B): schéma du site actif indiquant les acides aminés coordonnés à l'ion de zinc avec leur position .....	21
<b>Figure 13:(A):</b> La structure reconstituée d'une métallo-bêta-lactamase de la sous-classe B1, forme bi-nucléaire (Bacillus cereus II); (B): schéma du site actif indiquant les acides aminés coordonnés au premier et au deuxième ion zinc avec leurs positions .....	21
<b>Figure 14:</b> Mécanisme de réaction des sérine- $\beta$ -lactamases (SBL) et des MBL. ....	23
<b>Figure 15:</b> Arbre de Giroflier de Madagascar .....	30
<b>Figure 16:</b> Fleur de giroflier .....	30
<b>Figure 17:</b> Aspect morphologique de giroflier.....	30
<b>Figure 18:</b> Composé majeur de l'huile essentielle des clous de girofle.....	32
<b>Figure 19:</b> Structure chimique des trois composants des huiles essentielles. ....	32
<b>Figure 20:</b> Illustration des feuilles et fruits d'Eucalyptus globulus .....	38
<b>Figure 21:</b> Arbre de eucalyptusglobulus .....	38
<b>Figure 22:</b> Structure chimique de quelques composés détectés dans l'essence d'Eucalyptus globulus .....	39
<b>Figure 23:</b> L'extraction par un système Soxhlet.....	49
<b>Figure 24:</b> Evaporation sousvide par rotavapor de type Heidolph.....	50
<b>Figure 25:</b> Hydrodistillation par montage de type Clevenger .....	50
<b>Figure 26:</b> Test des flavonoïdes positive par coloration rose ou rouge.....	53
<b>Figure 27:</b> Culture bactérienne de escherchia coli cultivé dans le milieu gélose hektoen .....	54



<b>Figure 28:</b> La production de pigment par la bactérie <i>pseudomonas aeruginosa</i> (à droite) et <i>Escherchia coli</i> (à gauche) dans milieu Gélose King A.....	55
<b>Figure 29:</b> Préparation de préculture des souches culture jeune (24h) .....	56
<b>Figure 30:</b> Observation microscopique par coloration de Gram des souches étudiées <i>Escherchiacoli</i> (à droite) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (à gauche) .....	56
<b>Figure 31:</b> Préparation de test catalase sur la lame .....	58
<b>Figure 32:</b> Dégagement immédiat de bulles d'oxygène exprime le test catalase (+) pour <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (à droite) et <i>Escherchiacoli</i> (à gauche) .....	58
<b>Figure 33:</b> Remplissage des disques par les extraits dans la zone stérile.....	60
<b>Figure 34:</b> Activité antibactérienne ( <i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus mirabilis</i> et <i>pseudomonas aergenosa</i> ) d'extrait éthanolique et huile essentielle de <i>Syzyguimaromaticum</i> et <i>Eucalyptus globulus</i> , et antibiotique Imipénem.....	61
<b>Figure 35:</b> Activité antibactérienne ( <i>Escherichia coli</i> ) d'extrait éthanolique et huile essentielle de <i>Syzyguimaromaticum</i> et antibiotique Imipénem.....	61
<b>Figure 36:</b> Activité antibactérienne ( <i>pseudomonasaeruginosa</i> ) d'extrait éthanolique et huile essentielle de <i>Syzyguimaromaticum</i> et antibiotique Imipénem.....	62
<b>Figure 37:</b> Remplissage de microplaque pour la détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI de la souche <i>Escherchiacoli</i> par les dilution des extraits éthanoliques et huile essentielle de <i>Syzyguimaromaticum</i> et antibiotique Imipénem.....	63
<b>Figure 38:</b> Développement de la culture bactérienne <i>Escherchia coli</i> sur boites de Pétri contenant du milieu Gélose nutritive incubé pour la Détermination de la concentration minimale bactéricide de huile essentielle de extrait éthanolique de <i>Syzygium aromaticum</i> et Antibiotique imipénem.....	64
<b>Figure 39:</b> Incubation de l'inoculum dans un Bains-marie à agitation à 37°C pendant 18 h..	64
<b>Figure 40:</b> Nettoyage de culots cellulaires (après centrifugation à 3000 tr/min pendant 15 min) deux fois par Tampon phosphate PBS (phosphate buffered saline).....	65
<b>Figure 41:</b> Ultracentrifugation de milieu par appareil ultracentrifuge réfrigérée à 4 °C .....	65
<b>Figure 42:</b> Les culots récupérés dans 50 ml du tampon (0.2 M tris +0.1 M Hcl) .....	66
<b>Figure 43:</b> Histogramme représentant les différents rendements des différents extraits de <i>Eucalptusglobulus</i> .....	70
<b>Figure 44:</b> Histogramme représentant les différents rendements des différents extraits de <i>Eucalptusglobulus</i> .....	70
<b>Figure 45:</b> Courbe d'étalonnage de la capacité antioxydante totale des extraits, indique analyse quantitative des composé phénoliques de <i>Syzygium aromaticum</i> et l' <i>Eucalyptus globulus</i> est exprimée en nombre d'équivalents d'acide gallique.....	74
<b>Figure 46:</b> Courbe d'étalonnage de Test d'activité anti-radicalaire (DPPH) indique analyse quantitative des composés flavonoïdes de <i>Syzygium aromaticum</i> et <i>Eucalyptus globulus</i> est exprimée en nombre d'équivalents de catéchine.....	74
<b>Figure 47:</b> Préparation de test catalase sur la lame .....	77

---

<b>Figure 48:</b> Dégagement immédiat de bulles d'oxygène exprime le test catalase (+) pour <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (à droite) et <i>Escherichia coli</i> (à gauche) .....	77
<b>Figure 49:</b> Activité antibactérienne ( <i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus mirabilis</i> et <i>pseudomonas aergenosa</i> ) d'extrait éthanolique et huile essentielle de <i>Syzyguimaromaticum</i> , <i>Eucalyptus globulus</i> et <i>Imipénem</i> .....	78
<b>Figure 50:</b> Activité antibactérienne ( <i>Escherichia coli</i> ) d'extrait éthanolique et huile essentielle de <i>Syzyguimaromaticum</i> , <i>Eucalyptus globulus</i> et <i>Imipénem</i> .....	78
<b>Figure 51:</b> Activité antibactérienne ( <i>Proteus mirabilis</i> ) d'extrait éthanolique et huile essentielle de <i>Syzyguimaromaticum</i> , <i>Eucalyptus globulus</i> et <i>Imipénem</i> .....	78
<b>Figure 52:</b> Activité antibactérienne ( <i>pseudomonasaergenosa</i> ) d'extrait éthanolique et huile essentielle de <i>Syzyguimaromaticum</i> , <i>Eucalyptus globulus</i> et <i>Imipénem</i> .....	79
<b>Figure 53:</b> Activité antibactérienne ( <i>Escherichia coli</i> ) d'extrait éthanolique, huile essentielle de <i>Syzyguimaromaticum</i> et Antibiotique <i>Imipénem</i> .....	80
<b>Figure 54:</b> Activité antibactérienne (et <i>pseudomonas aeruginosa</i> ) d'extrait éthanolique, huile essentielle de <i>Syzyguimaromaticum</i> et Antibiotique <i>Imipénem</i> .....	80
<b>Figure 55:</b> Remplissage de microplaque pour la détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI de la souche <i>Escherchiacoli</i> par les dilution des extraits éthanoliques et huile essentielle de <i>Syzyguimaromaticum</i> et antibiotique <i>Imipénem</i> .....	82
<b>Figure 56:</b> Développement de la culture bactérienne <i>Escherchia coli</i> de huit puits sur boites de Pétri contenant du milieu Gélose nutritive incubé pour la Détermination de la concentration minimale bactéricide de huile essentielle de extrait éthanolique de <i>Syzygium aromaticum</i> (à droite) Antibiotique <i>imipénem</i> et la synergie ( <i>Imp+ EDTA</i> ) (à gouche).. .....	84
<b>Figure 57:</b> Incubation de l'inoculum dans un Bains-marie à agitation à 37°C pendant 18 h..	85
<b>Figure 58:</b> Nettoyage de culots cellulaires (après centrifugation à 3000 tr/min pendant 15 min) deux fois par Tampon phosphate PBS (phosphate buffered saline) 124.....	86
<b>Figure 59:</b> Ultracentrifugation de milieu par appareil ultracentrifuge réfrigérée à 4 °C. ....	89
<b>Figure 60:</b> Ultracentrifugation de milieu par appareil ultracentrifuge réfrigérée à 4 °C. ....	87
<b>Figure 61:</b> Les culots récupérés dans 50 ml du tampon (0.2 M tris +0.1 M Hcl). ....	87

---

## Résumé

La résistance aux carbapénèmes des bactéries à Gram (-) par la production d'enzymes bêta-lactamases est le mécanisme le plus sévère de résistance bactérienne chez *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*, rapportée de manière croissante dans le monde entier, est le plus souvent liée à la production de bêta-lactamases de type métallo-bêta-lactamases (MBL). Ces enzymes nécessitent la présence de cation métallique qui est le Zinc comme un cofacteur dans leur site actif, et ils seront inhibés par l'addition de chélateur d'ions bivalents Acide Ethylène Diamine Tétra-acétique (EDTA). Nous avons essayé de rechercher un éventuel effet inhibiteur de l'activité de métallo-bêta-lactamases à partir des extraits de deux plantes bien connues par leur activité biologique il s'agit de: *Syzygium aromaticum* et *Eucalyptus globulus*. Les extraits éthanoliques étaient préparés par macération et les rendements étaient de 7% à 9% pour *Syzygium aromaticum* et *Eucalyptus globulus*, respectivement. Les huiles essentielles ont été obtenues par hydrodistillation avec un rendement qui varie de 1.2 à 1.6 % pour *Syzygium aromaticum* et *Eucalyptus globulus*, respectivement. Deux souches de référence ont été testées pour leur production des MBLs (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Escherichia coli* ATCC 25922) par le test CDT (Combined Disk Test Imipenème-EDTA) en utilisant l'imipenème et Acide Ethylène Diamine Tétra-acétique (EDTA) et les résultats montrent que les deux souches sont productrices des MBLs avec un diamètre de la zone d'inhibition supérieur à 13 mm. Les analyses quantitatives et qualitatives montrent que l'extrait semi-purifié de *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* est riche en protéines, et son activité enzymatique est sensible à Acide Ethylène Diamine Tétra-acétique (EDTA) et elles peuvent être inhibées par les extraits et les huiles essentielles de *Syzygium aromaticum* et *Eucalyptus globulus*.

**Mots clés:** Métallo- $\beta$ -lactamases, test CDT; Imipenem; Antibiorésistance; *Escherichia coli*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Syzygium aromaticum*; *Eucalyptus globulus*.

**Abstract**

Resistance to carbapenems in Gram (-) bacteria through the production of beta-lactamase enzymes is the most severe mechanism of bacterial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*, increasingly reported worldwide, is most often linked to the production of beta-lactamases of the metallo-beta-lactamase (MBL) type. These enzymes require the presence of a metal cation which is Zinc as a cofactor in their active site, and they will be inhibited by the addition of a divalent ion chelator (EDTA). We tried to find a possible inhibitory effect on the activity of metallo-beta-lactamases from extracts of two plants well known for their biological activity: *Syzygium aromaticum* and *Eucalyptus globulus*. Ethanol extracts were prepared by maceration and yields were 7-9% for *Syzygium aromaticum* and *Eucalyptus globulus*, respectively. The essential oils were obtained by hydrodistillation with a yield varying from 1.2 to 1.6% for *Syzygium aromaticum* and *Eucalyptus globulus*, respectively. Two reference strains were tested for their production of MBLs (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Escherichia coli* ATCC 25922) by the CDT test (CombinedDisk Test Imipenem-EDTA) using imipenem and EDTA and the results show that the two strains are producers of MBLs with a diameter of the zone of inhibition greater than 13 mm. Quantitative and qualitative analyzes show that the semi-purified extract of from *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* is rich in protein, and its enzymatic activity is sensitive to EDTA and they can be inhibited by extracts and essential oils of *Syzygium aromaticum* and *Eucalyptus globulus*.

**Keywords:** Metallo- $\beta$ -lactamases, CDT test; Imipenem; Antibiotic resistance; *Escherichia coli*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Syzygium aromaticum*; *Eucalyptus globulus*.

## ملخص

تعتبر مقاومة الكاربابينيمات في بكتيريا الجرام (-) من خلال إنتاج إنزيمات بيتا لاكتاماز هي أشد آليات المقاومة البكتيرية في *Pseudomonas aeruginosa* و *Escherichia coli*، والتي يتم الإبلاغ عنها بشكل متزايد في جميع أنحاء العالم ، غالبًا ما ترتبط بإنتاج الميتالو بيتا لاكتاماز (MBL). تتطلب هذه الإنزيمات وجود كاتيون معدني وهو الزنك كعامل مساعد في موقعها النشط، ويتم تثبيطها عن طريق إضافة خالب أيون ثنائي التكافؤ (EDTA) حاولنا إيجاد تأثير مثبت محتمل على نشاط metallo-beta-lactamases من مقتطفات من نباتين معروفين بنشاطهما البيولوجي *Syzygium aromaticum* و *Eucalyptus globulus*. تم تحضير مستخلصات الايثانول عن طريق النقع وكانت المحصول 7-9٪ لكل من *Syzygium aromaticum* و *Eucalyptus globulus* على التوالي. تم الحصول على الزيوت العطرية عن طريق التقطير المائي مع عائد يتراوح من 1.2 إلى 1.6٪ لكل من *Syzygium aromaticum* و *Eucalyptus globulus* ، على التوالي. تم اختبار سلالتين مرجعيتين لإنتاجهما من MBLs (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 و *Escherichia coli* ATCC 25922) عن طريق اختبار CDT (Combined Disk Test Imipenem-EDTA) باستخدام imipenem و EDTA وأظهرت النتائج أن السلالتين منتجة لـ MBLs مع قطر منطقة التثبيط أكبر من 13 مم. تظهر التحليلات الكمية والنوعية أن المستخلص شبه المنقى من *Pseudomonas aeruginosa* و *Escherichia coli* غني بالبروتين، ونشاطه الأنزيمي حساس لـ EDTA ويمكن تثبيطه بواسطة المستخلصات والزيوت الأساسية من *Syzygium aromaticum* و *Eucalyptus globulus*.

**الكلمات المفتاحية:** Metallo-β-lactamases، اختبار CDT؛ إميبينيم. مقاومة المضادات الحيوية الإشريكية القولونية؛ الزائفة الزنجارية *Syzygium aromaticum* أو كالبتوس جلوبولوس.

## Table des matières

Dédicace	
Remerciement	
Liste des abréviations .....	
Liste des tableaux .....	
Liste des figures.....	
Résumé .....	
Introduction Générale .....	1

### ***Chapitre I: Résistance bactérienne aux antibiotiques $\beta$ -lactamines (bêta-lactamines)***

I. Généralités sur les $\beta$ -lactamines .....	5
I.1. Définition .....	5
I.2. Les différentes classes de $\beta$ -lactamines.....	5
I.3. Structure des $\beta$ -lactamines .....	6
I.4. Mécanismes d'action des $\beta$ -lactamines .....	7
I.5. Résistance aux $\beta$ -lactamines .....	8
I.6. Résistance par sécrétion des $\beta$ -lactamases.....	9
I.6.1. Définition des $\beta$ -lactamases .....	9
I.6.2. Classification des $\beta$ -lactamases .....	10
I.6.2.1. La classification moléculaire d'Ambller .....	12

### ***CHAPITRE II : Généralités sur les Métallo- $\beta$ -lactamases***

II.1. Définition .....	16
II.2. Classification fonctionnelle des métallo- $\beta$ -lactamases .....	16
II.3. Structure moléculaire des métallo- $\beta$ -lactamases .....	17
II.3.1. Structure moléculaire commune .....	19
II.3.2. Structure du site actif .....	20
II.4. Mécanisme d'action des Métallo-bêta-lactamases.....	22
II.5. Souches productrices des métallo- $\beta$ -lactamases chez les entérobactéries .....	23
II.6. Les inhibiteurs des MBL.....	25
II.6.1. Dérivés du thioester, du thiol et du captopril.....	25
II.6.2. Dérivés de dicarboxylate, d'acide carboxylique et d'hydroxamate .....	26
II.6.3. Inhibiteurs à base de pyrrole .....	26
II.6.4. Produits naturels .....	26

**Chapitre III : Généralités sur deux plantes potentiellement inhibitrices de l'activité enzymatique des métallo-bêta-lactamase (*Eucalyptus globulus* et *Syzygium aromaticum* )**

III.1. Intérêt de l'étude des plantes médicinales.....	29
III.2. <i>Syzygium aromaticum</i> .....	29
III.2.1. Description botanique.....	29
III.2.2. Noms similaires de <i>Syzygium aromaticum</i> .....	31
III.2.2.1. Classification .....	31
III.2.2.1. Constituants chimiques du giroflier.....	32
III.2.2.2. Les huiles essentielles.....	32
III.3. Autres constituants .....	33
III.4. Activité antibactérienne .....	33
III.5. Effet hépatique et antioxydant.....	35
III.5.1. Effet anticancéreux .....	35
III.5.2. Effet sur les termites .....	35
III.5.3. Effet sur la maladie de Lyme.....	36
III.5.4. Effet interactif.....	36
III.5.5. Effets indésirables de clou de girofle .....	37
III.6. <i>Eucalyptus globulus</i> .....	37
III.7. Taxonomie botanique de l'espèce <i>Eucalyptus globulus</i> est la suivante .....	38
III.8. Composition chimique.....	39
III.9. Les activités biologiques de <i>Eucalyptus globulus</i> .....	40
III.9.1. Activité antibactérienne .....	40
III.9.2. Activité antifongique .....	41
III.9.3. Activité antivirale .....	41
III.9.4. Activité antiparasitaire.....	42
III.9.5. Bronchite chronique .....	42
III.9.6. Action analgésique .....	42
III.9.7. Hygiène buccale .....	42
III.9.8. Insectifuge .....	43

***Partie expérimentale***

***Chapitre IV. Matériel et méthode***

IV. Matériel .....	45
IV.1. Matériel végétal.....	45
IV.1.1. Les plantes étudiées .....	45
IV.1.2. Matériel d'extraction .....	45
IV.2. Matériel microorganisme .....	45
IV.2.1. Souches de références étudiées .....	45
IV.2.2. Matériel pour la préparation des milieux .....	45
IV.2.3. Matériel d'isolement.....	45
IV.2.4. Matériel pour l'identification .....	46
IV.2.4.1. Matériel de paille .....	46
IV.2.4.2. Matériel de laboratoire .....	46
IV.2.5. Matériel pour la conservation des souches.....	46
IV.2.6. Réactifs .....	46

IV.2.6.1. Réactifs pour l'identification.....	47
IV.3. Méthodes .....	47
IV.3.1. Préparation de l'extrait .....	47
IV.3.1.1. Dilapidation.....	48
IV.3.1.2. L'extraction.....	48
IV.4. Préparation de huile essentielle .....	50
IV.5. Calcul de rendement .....	50
IV.5.1. Pour les extraits .....	50
IV.5.2. Pour l'huile essentielles.....	51
IV.6. Tests phytochimiques (Screening phytochimique ) .....	51
IV.6.1. Les substances polyphénoliques.....	51
IV.7. Détermination de la teneur en polyphénols totaux (PPT) .....	51
IV.8. Détermination de la teneur en flavonoïdes totaux (FVT).....	52
IV.9. Identification bactérienne .....	53
IV.9.1. Identification macroscopique : par le milieu de culture sélectif .....	53
IV.9.2. Gélose Hektoen .....	53
IV.9.3. Gélose King Aet King B .....	54
IV.9.4. Examen microscopique .....	55
IV.9.4.1. Observation à l'état frais .....	55
IV.9.4.2. Coloration de Gram .....	55
IV.10. Tests biochimiques .....	57
IV.10.1. Recherche de la catalase.....	57
IV.11. Recherche des souches sécrétrices des métallo-bêta-lactamases .....	58
IV.11.1. Test à l'EDTA .....	58
IV.11.2. Technique test à l'EDTA_.....	58
IV.11.3. Préparation des suspensions bactériennes .....	59
IV.11.4. Ensemencement.....	59
IV.11.5. Préparation des disques .....	59
IV.11.6. Expression des résultats .....	60
IV.11.7 Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) .....	62
IV. 11.8.3. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB) .....	63
IV.12. Extrait semi-purifié de bêta-lactamases .....	64

## ***Chapitre V : Résultat discussion***

V. Détermination et calcul des rendements .....	69
V.1. Pour les extrait .....	69
V.2. Pour l'huile essentielle .....	69
V.3. Screening phytochimique .....	72
V.4. La courbe étallonage.....	74
V.4.1. Capacité antioxydant totale (CAT) .....	75
V.4.2. Test d'activité anti-radicalaire (DPPH) .....	75
V.5. Identification des bactéries .....	75
V.5.1'identification macroscopique et microscopique .....	75
V.5.2. Test biochimiques.....	76
V.5.2.1. Recherche de la catalase .....	76
V.6. Recherche des souches sécrétrices des metallo-bêta-lactamases.....	77
V.6.1. Test à l'EDTA .....	77



V.7. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI).....	81
V.8. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB).....	83
V.9. Extrait semi-purifié de bêta-lactamases .....	84
Conclusion général .....	88
Référence bibliographie.....	90

## *Introduction*



La résistance aux antibiotiques a conduit à une crise sanitaire mondiale, car les bactéries infectieuses résistantes deviennent de plus en plus répandues chaque jour dans le monde entier ; Selon le dernier rapport des centres du contrôle et la prévention des maladies (CDC), une ère post-antibiotique a commencé, où le succès médical **(Palacios et al., 2020)**.

Les approches de lutte contre les infections bactériennes sont menacées. Des études épidémiologiques révèlent une corrélation directe entre la consommation d'antibiotiques et l'émergence ou la dissémination de bactéries. Les antibiotiques peuvent éradiquer les micro-organismes sensibles, mais en même temps, ils introduisent une pression évolutive qui entraîne la sélection naturelle des résistants, ce qui peut reproduire et diffuser. Ces événements sont exacerbés par la mauvaise utilisation et l'utilisation abusive de des antibiotiques qui repoussent les limites de la résistance bactérienne **(Palacios et al., 2020)**.

Les antibiotiques  $\beta$ -lactamines sont les antibiotiques les plus utilisés en clinique à cause de leur large spectre mais ça provoque l'apparition des différents mécanismes de résistance développés par des bactéries. Parmi elles, la stratégie la plus courante est l'expression des  $\beta$ -lactamases, Ces enzymes catalysent l'hydrolyse de l'anneau bêta-lactame pour créer inefficace antimicrobiens **(Palacios et al.,2020)**

Les enzymes sont divisés en quatre classes basées sur le primaire similitude de séquence et mécanisme catalytique. Des classes A, C et D utilisent une sérine de site actif dans leur mécanisme d'action, alors que les bêta-lactamases de classe B nécessitent des cations métalliques divalents (Zn) pour catalysent l'hydrolyse des bêta-lactamines **(Ambler, 1980)**.

Les métallo-bêta-lactamases sont connues par de nombreux termes : les métallo-bêta-lactamases (MBL) parce qu'elles venir un métal pour agir sur le noyau lactame des beta-lactamines (contrairement aux bêta-lactamases à sérine), bêta-lactamases de la classe B (CBBL) parce qu'elles sont sensibles à l'EDTA et insensibles à l'acide clavulanique (contrairement aux classes A, C et D) selon la classification d'Ambler **(Rossolini et Docquier, 2007)**.

*Pseudomonas aeruginosa* présente une résistance intrinsèque à divers agents antimicrobiens (b-lactame et penem) en raison de sa membrane externe avec une faible perméabilité. Bien que certains autres mécanismes soient également responsables de leur résistance intrinsèque, notamment le système d'efflux qui expulse l'antibiotique de la cellule bactérienne, et la production d'une enzyme d'inactivation d'antibiotique. Cependant, cette

bactérie est un pathogène très diversifié qui est capable de s'adapter au milieu environnant. **(Pachori et al., 2019).**

Le clou de girofle (*Syzygium aromaticum*) est une plante médicinale et épice utilisé depuis longtemps par les guérisseurs traditionnels ayurvédiques de l'Inde pour soigner les affections respiratoires et digestives, et aussi elle est considérée comme une source riche en composés antimicrobiens bioactifs **(Kumar et al., 2014)**. Cette plante représente l'une des sources les plus riches en composés phénoliques tels que l'eugénol. Elle a une activité analgésique, avec des propriétés antibactérienne **(Mittal, 2014)**.

L'action de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* contre les souches résistantes à la méthicilline-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) se distingue également. Cependant, l'activité antimicrobienne semble être plus faible par rapport à certaines bactéries gram-négatifs telles que *Klebsiela*, *Pseudomonas* et *Acinetobacter* **(Ghedira et al., 2010)**

La présente étude s'intéresse par l'étude d'un éventuel effet inhibiteur de l'activité de métallobéta-lactamases à partir des extraits de deux plantes bien connues par leur activité biologique il s'agit de : *Syzygium aromaticum* et *Eucalyptus globulus*.

*Synthèse bibliographique*

---

## I. Généralités sur les $\beta$ -lactamines

### I.1. Définition

Les  $\beta$ -lactamines sont des médicaments antibiotiques actifs contre certaines bactéries et représentent la famille d'antibiotiques la plus développée et la plus utilisée dans le monde. Cette large utilisation est due à leur large spectre d'action, leur faible toxicité, leur efficacité pour certaines molécules et leur faible coût. Elles représentent une vaste famille d'antibiotiques bactéricides qui possèdent comme structure de base le cycle  $\beta$ -lactame (Figure 1) (Kallaba, 2017).

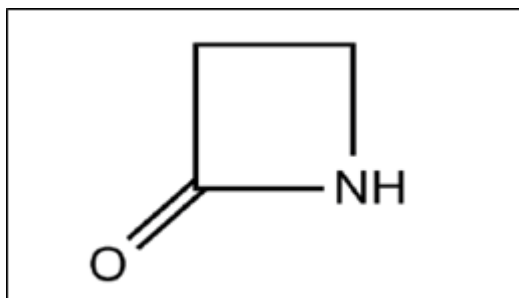
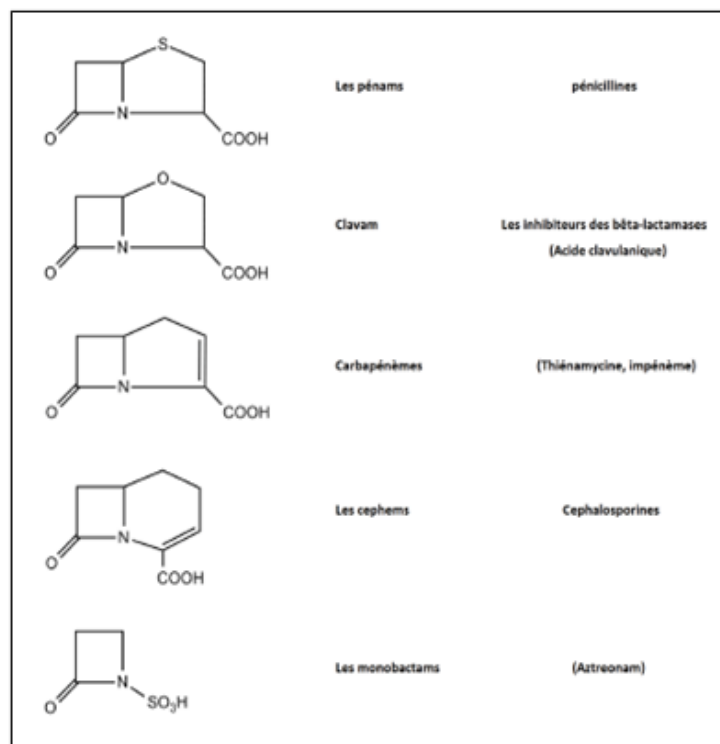


Figure 1: Cycle  $\beta$ -lactame (Kallaba, 2017)

### I.2. Les différentes classes de $\beta$ -lactamines

Pénicilline G (voie parentérale) et (voie orale), Pénicilline M (méticilline), Pénicilline A (aminopénicilline), Carboxy pénicilline (ticarcilline), réservées à l'usage hospitalier, qui outre le spectre de l'ampicilline agissent sur les entérobactéries hospitalières et les *Pseudomonas* ticarcilline-sensible. Uréido-pénicilline (pipéracilline), de spectre analogue à la ticarcilline, réservées à l'usage hospitalier, Amidino-pénicillines (pivmécillinam) spectre limité aux Entérobactéries, Lespénems : carbapénèmes (imipénème, méropénème) réservés aux infections hospitalières à germes résistants, Les céphems : qui comportent 3 classes : 1ère, 2ème, 3ème et 4ème génération et les céphalosporines monobactams (aztréonam) réservés aux infections hospitalières sévères) (Kallaba, 2017)

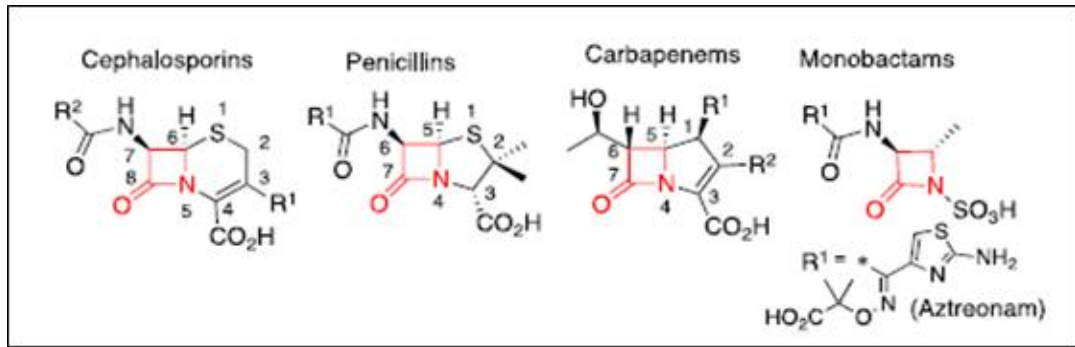


**Figure 2:** Structures chimiques des principaux noyaux des  $\beta$ -lactamines (Kallaba, 2017)

### I.3. Structure des $\beta$ -lactamines

Ces composés partagent, en tant que groupe actif commun, un amide cyclique à quatre chaînons appelé cycle  $\beta$ -lactame (Figure 3). Sa similitude avec le dimère terminal D-Ala D-Ala du peptidoglycane déclenche une reconnaissance croisée par les protéines de liaison à la pénicilline (PBP), ce qui affaiblit par conséquent la bactérie membrane et provoque la lyse cellulaire. Les antibiotiques  $\beta$ -lactamines les plus utilisés en clinique (céphalosporines, pénicillines et carbapénèmes) ont un cycle supplémentaire à cinq ou six chaînons. Au lieu de cela, un seul un composé  $\beta$ -lactame monocyclique est utilisé en clinique, le monobactamaztréonam (Figure 3). Ces structures de base peuvent être décorées avec différents substituants aboutissant à des dérivés avec propriétés diverses telles que la tolérance acide (permettant son administration orale) et un large spectre antimicrobien. (Palacios et al., 2020).

Dans les céphalosporines, le cycle  $\beta$ -lactame est fusionné à un cycle contenant du soufre à six chaînons, le cycle dihydrothiazine (Figure 3). Il s'agit de la classe la plus largement prescrite et la plus diversifiée de  $\beta$ -les lactames, car ils ont deux substituants variables R1 et R2 en position C3 et C9, respectivement.

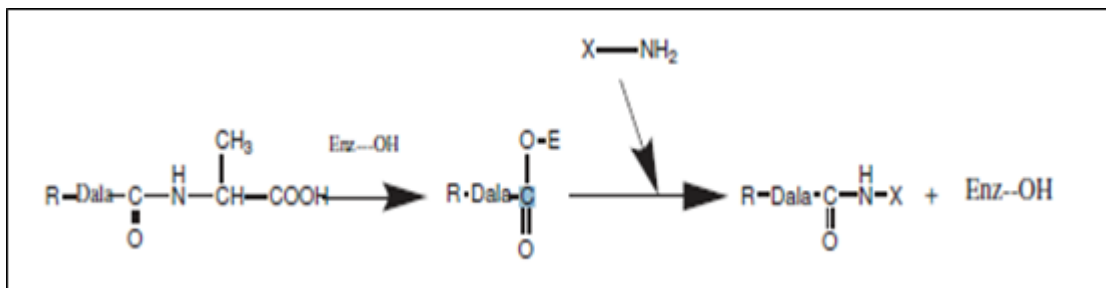


**Figure 3:** Échafaudage général des antibiotiques  $\beta$ -lactamines cliniques avec leur numérotation atomique respective Le cycle  $\beta$ -lactame est représenté en rouge (**Palacios et al., 2020**)

#### I.4. Mécanismes d'action des $\beta$ -lactamines

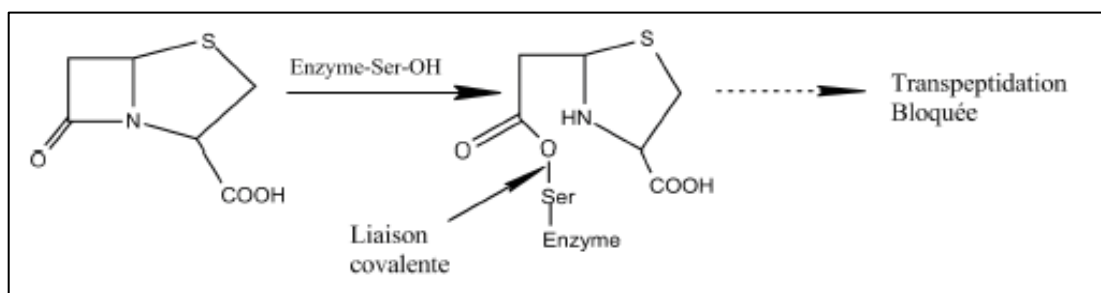
Le mécanisme d'action est général pour toutes les molécules de la famille des  $\beta$ -lactamines sont des inhibiteurs de la synthèse de la paroi bactérienne (synthèse du peptidoglycane, constituant principal de la paroi bactérienne) par une inactivation des principales enzymes impliquées dans cette construction et regroupés sous le terme de PLP (Protéines Liant les Pénicillines) : Transpeptidases, Endo-peptidases et Carboxypeptidases. (**Kallaba, 2017**).

En mimant la structure tridimensionnelle de la séquence D-Ala-D-Ala, les  $\beta$ -lactamines se comportent comme des inhibiteurs de la transpeptidase (figure 4) (figure 5), enzyme essentielle à la synthèse de la paroi bactérienne. Elles forment une liaison covalente avec l'enzyme et empêchent donc toute activité de celle-ci, les  $\beta$ -lactamines sont des substrats-suicide. L'affinité est variable en fonction de la molécule et des PLP cibles ce qui explique les différences de concentration minimale inhibitrice (CMI) des différentes  $\beta$ -lactamines pour une même bactérie (**Kallaba, 2017**)



**Figure 4 :** Réaction de transpeptidation catalysée par la transpeptidase (**Kallaba, 2017**)





**Figure 5:** Blocage de la réaction de transpeptidation par une  $\beta$ -lactame. (Kallaba, 2017)

Les  $\beta$ -Lactamines sont des antibiotiques bactéricides "temps-dépendants" dont l'activité est en fonction du temps d'exposition à une concentration supérieure à la CMI et car leur activité disparaît au fur et à mesure que leur concentration décroît au niveau de leur cible. Pour Obtenir une efficacité maximale, il faut que la concentration au site de l'infection soit maintenue le plus longtemps possible au-dessus de la CMI de la bactérie cible. (Kallaba, 2017)

### I.5. Résistance aux $\beta$ -lactamines

La résistance aux antibiotiques est un phénomène plus ancien que l'apparition des antibiotiques. Une bactérie est considérée comme résistante à un antibiotique quand la concentration de cet antibiotique au site de l'infection n'est pas suffisamment élevée pour inhiber la production de cette bactérie ou de la tuer (Pachori et al., 2019).

Les bactéries ont développé différents mécanismes pour résister aux  $\beta$ -lactamines, elles possèdent plusieurs mécanismes de résistance associés. Le mécanisme le plus important des bactéries pour contrecarrer l'activité des  $\beta$ -lactamines est la production d'enzyme de type  $\beta$ -lactamase. Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes qui hydrolysent et inactivent les  $\beta$ -lactamines, elles catalysent l'hydrolyse de la liaison amide du cycle  $\beta$ -lactame. Ce cycle se comporte comme un substrat-suicide d'enzymes, commun à toutes les molécules de la famille  $\beta$ -lactamines d'antibiotiques. (Pachori et al., 2019).

Il existe deux types de résistance par production de  $\beta$ -lactamase, en effet la synthèse de ces enzymes est codée ; soit par un gène chromosomique présent chez toutes les souches d'une même espèce, on parle alors de résistance naturelle aux  $\beta$ -lactamines ; soit par un gène porté par un élément génétique mobile de type plasmide ou transposon, et peut être présent chez une souche particulière, on parle alors de résistance acquise. L'utilisation abusive des  $\beta$ -lactamines est l'origine de l'apparition de nouvelles enzymes ou d'enzyme mutantes dans le domaine de la santé humaine et animale et en agriculture. (Pachori et al., 2019).

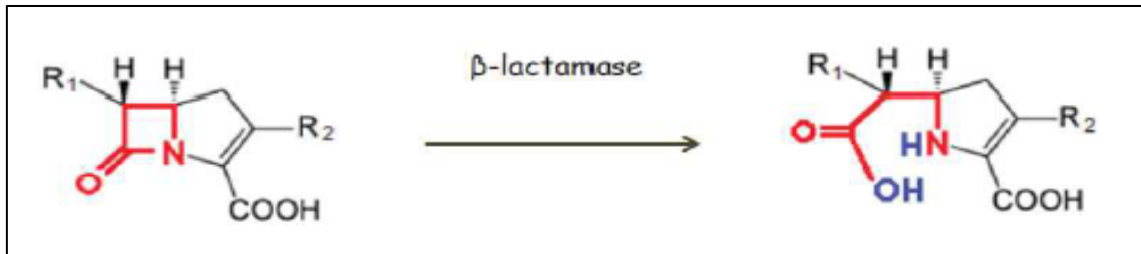
## I.6. Résistance par sécrétion des $\beta$ -lactamase

### I.6.1. Définition des $\beta$ -lactamases

Les maladies infectieuses sont responsables de 45 % des décès dans les pays à faibles revenus et de presque une mortalité prématurée sur deux dans le monde entier. Les infections bactériennes représentent 70 % des cas de mortalité causés par les microorganismes. (Kallaba, 2017)

Les bactéries ont développé différents mécanismes pour contrecarrer l'action des  $\beta$ -lactamines, entre autres la modification de la cible (Protéines liants Pénicillines) qui les rend moins sensibles aux  $\beta$ -lactamines mais permet de maintenir son activité physiologique normale ; la production des enzymes ( $\beta$ -lactamases) qui inactivent les  $\beta$ -lactamines par modification chimique. (Kallaba, 2017)

Les  $\beta$ -lactamases catalysent de manière efficace et irréversible l'hydrolyse de la liaison amide du cycle  $\beta$ -lactame des antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactamines (Figure 1)], donnant un produit biologiquement inactif qui perd totalement son activité antimicrobienne. (Kallaba, 2017)



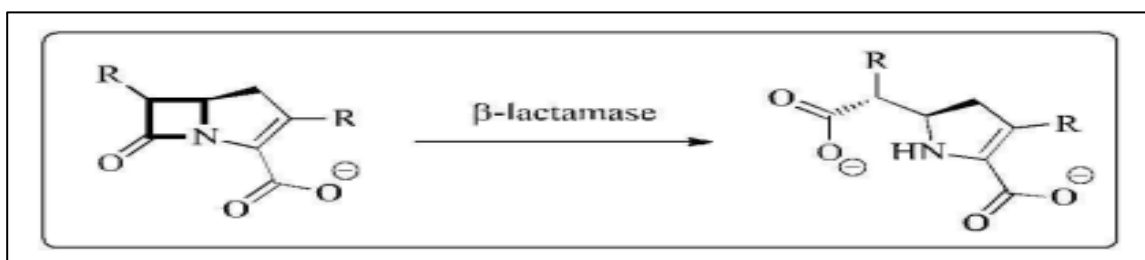
**Figure 6:** Mécanisme proposé pour l'hydrolyse des carbapénèmes par une  $\beta$ -lactamase (noyau  $\beta$ -lactame en rouge et molécule d'eau en bleu). (Kallaba, 2017)

La production des  $\beta$ -lactamases est le mécanisme de résistance le plus répandu et le plus important des bactéries vis-à-vis des  $\beta$ -lactamines. Plus de 290 types de  $\beta$ -lactamases sont décrits et classés suivant leur structure primaire en 4 classes (A-D), La plus grande partie des  $\beta$ -lactamases a été mise en évidence chez les bacilles à Gram négatif (-) qui sont par ailleurs responsables de la majorité des infections hospitalières (60%) et sont de plus en plus multirésistants. (Palacios et al.,2020)

Il existe plusieurs mécanismes par lesquels les bactéries deviennent résistantes aux antibiotiques  $\beta$ -lactamines, Le mécanisme de résistance le plus répandu (à la fois chez les bactéries Gram-négatives (-) et Gram-positives (+)) est l'expression d'enzymes hydrolytiques  $\beta$ -lactamases. (Palacios et al.,2020)

Ces enzymes catalysent le clivage de la liaison amide des  $\beta$ -lactamines (Figure 1), rendant les antibiotiques inefficaces contre leurs cibles. Plus de 4000  $\beta$ -lactamases ont été identifiées à ce jour, et sur la base de leurs structures caractéristiques, elles sont réparties en quatre groupes de A à D (classification d'Ambler) (Palacios et al.,2020)

Classes A, C, et D sont des sérine- $\beta$ -lactamases (SBL) qui utilisent un résidu Ser activé comme nucléophile pour hydrolyser les antibiotiques  $\beta$ -lactamines Parmi elles, les  $\beta$ -lactamases de classe A ont été les premières à être découverts et ont été minutieusement étudiés, D'autre part, la classe B est dépendante du Zn(II) généralement appelées métallo- $\beta$ -lactamases (MBL). Ces enzymes ne partager toute homologie structurelle, mécanistique ou de séquence avec les SBL, indiquant une origine évolutive indépendante. Alors que différents SBL ont des profils de substrat spécifiques, et seuls quelques-uns d'entre eux sont actifs contre les carbapénèmes, les MBL hydrolysent tous les antibiotiques  $\beta$ -lactamines avec à l'exception de l'aztréonam et du céfidérocol récemment autorisé et leur pertinence clinique est en raison de leur puissante activité carbapénémase, Contrairement aux SBL, il n'y a pas de inhibiteurs approuvés des MBL. (Palacios et al.,2020).

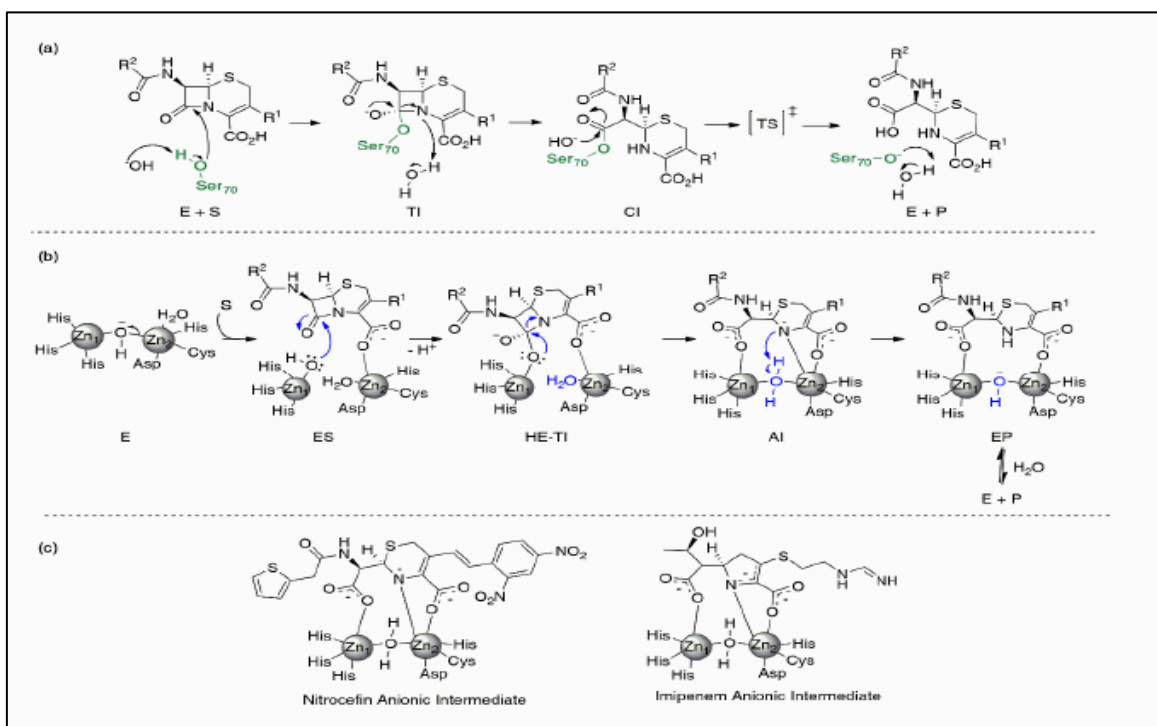


**Figure 7:** Hydrolyse des antibiotiques  $\beta$ -lactamines par l'enzyme de  $\beta$ -lactamase (Palacios et al.,2020)

### I.6.2. Classification des $\beta$ -lactamase

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation, d'une extrême diversité, de type sérine ou métalloenzyme catalysent l'hydrolyse irréversible du cycle  $\beta$ -lactame au moyen de mécanismes de réaction sensiblement différents (Figure 8).Les  $\beta$ -lactamases de type sérine (SBL) possèdent dans leur site actif une sérine qui intervient dans le mécanisme d'acylation au cours de l'hydrolyse des b-lactamines, t un résidu Ser essentiel pour catalyse (Figure 8), résultant d'une évolution du mécanisme, une le groupe hydroxyle activé de ce résidu est responsable de l'attaque nucléophile sur l'amide liaison de la  $\beta$ -lactame. Cette étape produit un intermédiaire de réaction connu sous le nom de tétraédrique intermédiaire, basé sur l'hybridation  $sp^3$  de l'atome de carbone dérivé du  $\beta$ -lactame. Ce implique une liaison

covalente entre l'ancien carbone carbonyle du  $\beta$ -lactame et l'oxygène du résidu Ser du site actif (Figure 8), L'intermédiaire tétraédrique a une charge négative qui est stabilisée par des interactions avec une fente chargée positivement sur le site actif, connue sous le nom de trou d'oxyanion. Ensuite, le clivage de la liaison amide donne lieu à la formation d'une acylenzyme covalente intermédiaire (Figure 8) La dernière étape de la réaction est la protonation et le clivage de la liaison covalente qui maintient le produit hydrolysé lié à l'enzyme. Cet événement de désacylation est l'étape limitante du mécanisme Par contre l'activité des métallo- $\beta$ -lactamases nécessite la présence d'ions métalliques le zinc. (Palacios et al.,2020)



**Figure 8:** Mécanisme de réaction des sérine- $\beta$ -lactamases (SBL) et des MBL. Mécanismes réactionnels généraux pour l'hydrolyse des céphalosporines par (a) les SBL et (b) les MBL. (c) Intermédiaires de réaction formés au cours de l'hydrolyse de la nitrocefine et de l'imipénème par les MBL. Les abréviations suivantes ont été utilisées: Enzyme (E), substrat (S), intermédiaire tétraédrique (TI), intermédiaire covalent (CI), produit (P), Enzyme : complexe de substrat (ES), intermédiaire tétraédrique à haute énergie (HE-TI), anionique Intermédiaire (AI) et Enzyme: Complexe Produit (EP) ( Palacios et al.,2020)

La classification de Bush-Jacoby et Medeiros: établie selon les propriétés fonctionnelles de l'enzyme définies par son substrat préférentiel et son profil d'hydrolyse. (Kallaba, 2017). La classification moléculaire de Ambler: tient compte de la structure primaire des différentes  $\beta$ -lactamases et les divise en quatre classes (A à D). La classification de Richmond-Sykes : basée sur les propriétés fonctionnelles de l'enzyme définies par son

substrat préférentiel., Les classifications fonctionnelles considèrent la fonctionnalité des  $\beta$ -lactamases (substrat, profil d'inhibition) et divisent aussi ces enzymes en quatre groupes (1 à 4) et plusieurs sous-groupes. (Kallaba, 2017)

(Le tableau dans la figure 8 montre les corrélations entre la classification proposée et d'autres régimes fréquemment cités.)

Bush-Jacoby-Medeiros group	1989 Bush group (44)	Richmond-Sykes class (253)	Mitsuhashi-Inose type (194) <sup>a</sup>	Molecular class (2, 121, 132)	Preferred substrates	Inhibited by:		Representative enzymes
						CA <sup>b</sup>	EDTA	
1	1	Ia, Ib, Id	CSase	C	Cephalosporins	-	-	AmpC enzymes from gram-negative bacteria; MIR-1
2a	2a	Not included	PCase V	A	Penicillins	+	-	Penicillinases from gram-positive bacteria
2b	2b	III	PCase I	A	Penicillins, cephalosporins	+	-	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2bc	2b'	Not included except K1 in class IV	CXase	A	Penicillins, narrow-spectrum and extended-spectrum cephalosporins, monobactams	+	-	TEM-3 to TEM-26, SHV-2 to SHV-6, <i>Klebsiella oxytoca</i> K1
2br	Not included	Not included	Not included	A	Penicillins	±	-	TEM-30 to TEM-36, TRC-1
2c	2c	II, V	PCase IV	A	Penicillins, carbenicillin	+	-	PSE-1, PSE-3, PSE-4
2d	2d	V	PCase II, PCase III	D	Penicillins, cloxacillin	±	-	OXA-1 to OXA-11, PSE-2 (OXA-10)
2e	2e	Ic	CXase	A	Cephalosporins	+	-	Inducible cephalosporinases from <i>Proteus vulgaris</i>
2f	Not included	Not included	Not included	A	Penicillins, cephalosporins, carbapenems	+	-	NMC-A from <i>Enterobacter cloacae</i> , Sme-1 from <i>Serratia marcescens</i>
3	3	Not included	Not included	B	Most $\beta$ -lactams, including carbapenems	-	+	L1 from <i>Xanthomonas maltophilia</i> , CcrA from <i>Bacteroides fragilis</i>
4	4	Not included	Not included	ND <sup>c</sup>	Penicillins	-	?	Penicillinase from <i>Pseudomonas cepacia</i>

**Figure 9:** Schémas de classification des  $\beta$ -lactamases des bactéries (Kallaba, 2017).

### I.6.2.1. La classification moléculaire d'Amblar

#### - Classe A:

La classe A est la plus diversifiée, Elle comprend des pénicillinases des bactéries à Gram positif, des céphalosporinases 2 inductibles (AmpA) chromosomiques ou plasmidiques, sensibles à l'acide clavulanique et les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi hydrolysant les céphalosporines de 3<sup>e</sup>me génération et les monobactames. Généralement, les  $\beta$ -lactamases de classe A sont caractérisées par un poids moléculaire (PM) moyen de 29 KDa et un point isoélectrique 3 (pI) variable de 5,4 à 8,2. En revanche la plupart de ces enzymes sont sensibles aux inhibiteurs suicides (acide clavulanique, sulbactame et

tazobactame) utilisés en médecine. Les représentants de ce groupe sont les enzymes du type TEM, SHV et plus récemment le type CTX-M. (Kallaba, 2017)

- **Classe C:**

Cette classe est constituée de céphalosporinases (AmpC), chromosomiques ou plasmidiques ; résistantes à l'acide clavulanique et le sulbactame. L'hyperproduction de ces enzymes est liée au phénotype de multi-résistance observée chez certains bacilles à Gram négatif. Cependant, certaines d'entre elles sont faiblement inhibées par le tazobactame. Les  $\beta$ -lactamases de classe C sont généralement caractérisées par un PM moyen de 40 KDa et un pI variable compris entre 7 et 9. Les principaux représentants de ce groupe sont les  $\beta$ -lactamases du type, AmpC, FOX, ACT, CMY. (Kallaba, 2017)

- **Classe D:**

Dans la classe D, on retrouve les oxacillinases (AmpD) qui sont les  $\beta$ -lactamases hydrolysant les isoxazolylpénicillines comme la cloxacilline et l'oxacilline, le plus souvent plasmidiques, de phénotype pénicillinases peu sensibles aux inhibiteurs, pouvant être inhibées par le NaCl. Ces enzymes sont plus ou moins résistantes à l'action de l'acide clavulanique, en revanche elles sont bien inhibées par le tazobactame [3]. Le PM des enzymes de cette classe est très variable (23 à 40 KDa) et le pI peut varier de 6 à 8,6 et les représentants de ce groupe sont les  $\beta$ -lactamases du type OXA. (Kallaba, 2017)

- **Classe B:**

Classe B sont des métallo- $\beta$ -lactamases qui hydrolysent une variété de pénicillines et de céphalosporines et pouvant être inhibées par l'EDTA. Cette classe constitue le groupe des métallo-enzymes zinc-dépendantes, toutes les métallo-enzymes ont comme point commun, la présence sur l'ion métallique coordonné à la protéine d'un site de coordination labile permettant la fixation d'un substrat lors de la réaction enzymatique. Ces enzymes se caractérisent par un PM moyen d'environ 26 à 28 KDa et un pI compris entre 5 et 10,5. La grande importance clinique de ces enzymes est associée à l'hydrolyse des carbapénèmes, ce sont des antibiotiques qui échappent à l'activité des  $\beta$ -lactamases à sérine active. La plupart des métallo- $\beta$ -lactamases sont insensibles aux inhibiteurs classiques (acide clavulanique, sulbactame, tazobactame), ce qui rend le choix difficile d'une antibiothérapie efficace et la production de ces enzymes par les bactéries pathogènes telles *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacteroides fragilis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Chryseobacterium meningosepticum*, et *Acinetobacter*

*baumannii*. A partir de la séquence des enzymes, cette classe est subdivisée en trois sous classes, B1, B2, et B3. (Kallaba, 2017).

***CHAPITRE II.***  
***Généralités sur les Métallo-  $\beta$ -lactamases***

---



## II.1. Définition

Les métallo- $\beta$ -lactamases sont des hydrolases (EC 3.5.2.6) bactériennes qui hydrolysent le cycle  $\beta$ -lactame des antibiotiques de type beta-lactamines et dont l'activité nécessite le zinc. Ces enzymes font partie d'une large famille de protéines caractérisées par la présence d'un domaine conservé, nommée la superfamille des métallo- $\beta$ -lactamases ou famille du zinc-métallohydrolase (**Rossolini et Doccquier, 2007**).

Les métallo- $\beta$ -lactamases sont codées soit par des gènes faisant partie du chromosome chez certaines espèces bactériennes (MBL résidentes), ou par des gènes hétérologues acquis par gène horizontal transfert (MBL acquis). Les métallo- $\beta$ -lactamases répandus comprennent l'imipenemase (IMP), Verona métallo-bêta-lactamase (VIM) codée par des intégrons et New métallo- $\beta$ -lactamases de Delhi (NDM). Les MBL étaient fréquent chez *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter spp.*, mais plus récemment ont émergé à un taux parmi les membres des Enterobacteriaceae, la catalyse MBL est inhibée en présence de agents chélateurs de métaux comme l'éthylènediaminetétraacétique acide (EDTA). (**Bora, 2014**).

## II.2. Classification fonctionnelle des métallo- $\beta$ -lactamases

Sur la base d'un critère moléculaire, les MBL sont divisés en trois sous-classes (B1, B2 et B3) qui diffèrent par les résidus du site actif, la teneur en métal requise et le profil du substrat (**Palacios et al.,2020**)

- **La classe B1**: les enzymes ont besoin de deux ions Zn(II) pour être pleinement actives et avoir un large spectre de substrats. Le plus les MBL cliniquement pertinentes telles que les familles NDM, VIM, IMP, SPM et CcrA, appartiennent à cette sous-classe. Les gènes codant pour la plupart de ces enzymes ont été disséminés dans le monde sur des éléments génétiques mobiles, aggravant la propagation géographique de la résistance. Plusieurs variantes de ces enzymes peuvent être trouvées dans des agents pathogènes à Gram négatif (-) tels que *Pseudomonas*, *Klebsiella* et espèces *Acinetobacter*, entre autres. BcII, la  $\beta$ -lactamase de la bactérie non pathogène *Bacillus cereus*, appartient également à la sous-classe B1 et a été le premier MBL décrit. En effet, cette enzyme a été initialement signalé en (1966), bien avant que les MBL ne se généralisent dans le cadre clinique, et a été employés pour réaliser la plupart des études séminales. (**Palacios et al.,2020**)

- **La classe B2** : sont codés de manière chromosomique enzymes actives avec un seul ion Zn(II) et sont des carbapénémases spécifiques, présentant une faible hydrolyse capacités contre les pénicillines et les céphalosporines. CphAd'*Aeromonashydrophila*, Sfh-I de *Serratia fonticola*

et *ImiS* d'*Aeromonas sobria* sont des membres représentatifs de ce groupe. **(Palacios et al., 2020)**

- **La classe B3** : peuvent être actives avec un ou deux ions Zn(II), ont un large spectre de substrats et, remarquablement, seuls 9 résidus sont conservés parmi ces enzymes et les MBL B1 et B2 GOB d'*Elizabethkingia meningoseptica*, L1 de *Stenotrophomonas maltophilia* et FEZ de *Legionella gormanii* sont les MBL B3 les plus étudiées. **(Palacios et al., 2020)**

### II.3. Structure moléculaire des métallo- $\beta$ -lactamases

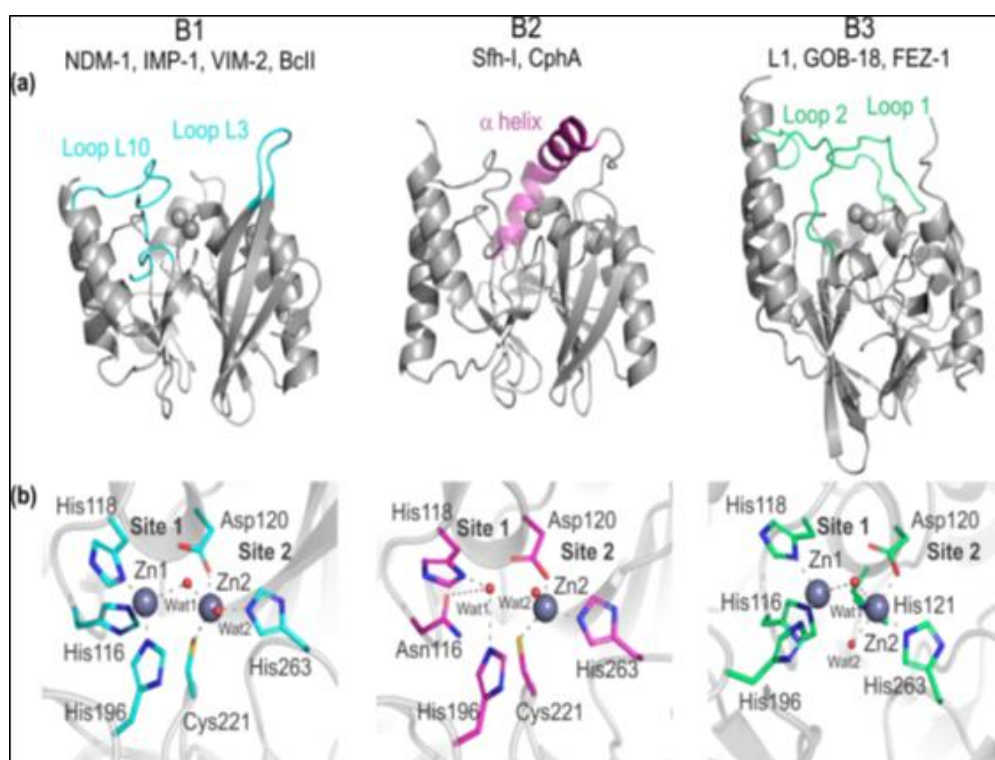
Le pli caractéristique de tous les MBL est un sandwich  $\alpha\beta/\beta\alpha$ , avec deux feuilletts  $\beta$  centraux et cinq hélices  $\alpha$  exposées au solvant (Figure 10). Le site actif du métal est situé sur une large rainure délimitée par l'interface de deux domaines. Dans les enzymes B1, le site actif est flanqué de deux fonctions fonctionnellement pertinentes boucles nommées L3 et L10 (Figure 10). L3 est mobile et il a été démontré qu'il joue plusieurs rôles dans liaison au substrat et catalyse par des interactions hydrophobes dépendantes des enzymes. **(Palacios et al., 2020)**

En B2 enzymes, une hélice  $\alpha$  allongée ( $\alpha_3$ ) se ferme sur la rainure du site actif fournissant hydrophobe interactions qui forment une paroi hydrophobe. L'orientation de  $\alpha_3$  dans les enzymes B2 limite l'accessibilité des substrats volumineux et a été proposé d'être responsable de leur substrat restreint spectre. **(Palacios et al., 2020)**

Dans les enzymes B3, deux boucles mobiles nommées 1 et 2 délimitent le site actif et sont également impliqués dans la reconnaissance du substrat. La flexibilité des boucles mobiles flanquant les sites actifs déjà larges des enzymes B1 et B3 facilitent la liaison et l'hydrolyse de différents substrats et adaptation aux différents défis évolutifs. Une stratégie commune pour concevoir de nouveaux antibiotiques échappant à l'action des SBL a reposé sur l'inclusion de substituants volumineux dans le échafaudages  $\beta$ -lactamines classiques. Cependant, la plasticité des sites actifs des MBL leur permet d'accueillir des composés avec des substituants plus grands et invalide cette stratégie. Les MBL ont deux sites de liaison aux métaux, le site 1 et le site 2 (Figure 10b), dont les caractéristiques diffèrent entre les sous-classes distinctes. Dans les enzymes B1, deux ions Zn(II) sont liés au site actif, avec un pont molécule d'eau/hydroxyde (Wat1). Le Zn(II) sur le site 1 (Zn1) est coordonné à His116, His118, His196 et Wat1 (schéma de numérotation MBL standard utilisé partout), et le deuxième ion (Zn2) est coordonné à Asp120, Cys221, His263, Wat1 et une seconde molécule d'eau (Wat2) (Figure 10b). Dans les enzymes B3, le site 1 des  $\beta$ -lactamases B1 est préservé, tandis que le site 2 implique résidus Asp120, His121

et His263 en tant que ligands métalliques (Figure 10b). Enzymes B3 de la famille GOB peut être pleinement actif avec un seul ion métallique situé dans le site 2. (Palacios et al., 2020).

Enfin, les enzymes B2 sont actives avec un seul ion Zn(II) lié à un ensemble de ligands similaire à celui du site Zn2 de la sous-classe B1. Une substitution His166Asn, présente dans toutes les enzymes B2, modifie la conformation du Zn1 typique site de telle sorte que la liaison d'un second équivalent métallique inactive ces  $\beta$ -lactamases. Dans en plus de ces caractéristiques du site actif, plusieurs résidus sont impliqués dans le substrat/inhibiteur liaison tel qu'un résidu chargé positivement en position 224 (typiquement un résidu Lys), 233 (Asn) et 228 (un Arg de la famille VIM), (Palacios et al.,2020)



**Figure 10:** Structures représentatives des trois sous-classes de métallo- $\beta$ -lactamases (MBL): B1 NDM-1 (PDB 3spu), B2 Sfh-I (PDB 3sd9) et B3 L1 (PDB 1sml). (a) Structures protéiques globales. Boucles et les hélices impliquées dans les interactions avec le substrat sont représentées en couleur. (b) Sites actifs. Les ions Zn(II) sont représentés par sphères grises et molécules d'eau/OH sous forme de sphères rouges. Les interactions Zn(II) sont représentées par des lignes pointillées et les ligands métalliques sont représentés en couleur. Les résidus sont numérotés selon la norme MBL schéma de numérotation. Pour l'enzyme B2 Sfh-I, la forme active mono-Zn(II) est représentée. (Palacios et al.,2020)

### II.3.1. Structure moléculaire commune

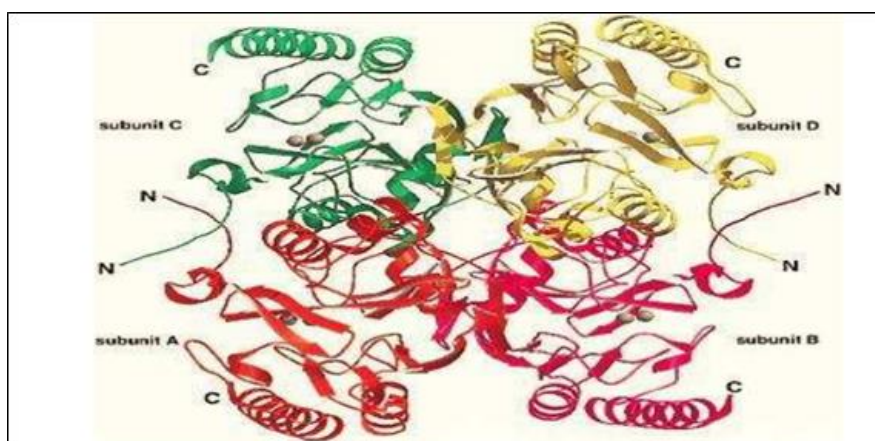
*Métallo-  $\beta$ -lactamases* sont des hydrolases qui contiennent en moyenne 230 résidus d'acides aminés. Leurs poids moléculaires varient entre 25 et 118 KDa; leurs point Isoelectrique varient entre 2,5 et 10,5. Comme il a été rapporté dans leur classification, ce groupe d'enzyme est subdivisé en trois sous-classes B1, B2 et B3 selon le pourcentage d'homologie de structures primaires, Celui-ci varie approximativement de 25% à 40% dans une même sous-classe et de 10% à 20% entre deux sous classes, Ces pourcentages d'analogie reflètent en fait une importante diversité en acides aminés non seulement entre deux sous-classes mais également au sein d'une même sous-classe. Les pourcentages relatifs peuvent atteindre 89% entre la sous-classe B1 et la sous-classe B3 et 79%, 51%, 78% au sein des sous-classes B1, B2 et B3, respectivement. La comparaison par alignement des structures primaires, révèle l'existence de quatre résidus strictement conservés parmi tous les MBLs (His118, Asp120, His196, His263). La même comparaison révèle également l'existence de 17 résidus d'acides aminés hautement conservés entre les membres de la sous-classe B1 (His116, His118, Asp120, Thr142, Gly193, His196, Asp199, Asn200, Val202, Leu217, Gly219, Gly220, Cys221, Gly232, Trp244, His263 et Thr303) et 16 résidus entre les membres de la sous-classe B3 (Pro45, Gly56, Thr57, Gly79, Gly103, Asp108, His118, Asp120, His121, Ala134, Gly149, Gly183, Gly195, His196, Gly199 et His263). Plus précisément, les 17 résidus conservés de la sous-classe B1 existent dans le domaine C-terminal alors que les 16 résidus conservés de la sous-classe B3 existent dans le domaine N-terminal (**Rossolini et Docquier, 2007**)

Les structures secondaires de toutes les MBLs comprennent des structures  $\alpha$  (hélices), des structures  $\beta$  (feuillettes) et des boucles dont leurs nombres sont de 5, de 12 et de 1, dans l'ordre. Malgré la faible analogie de leurs structures primaires, toutes les MBLs connues présentent une structure tertiaire de type  $\alpha\beta/\beta\alpha$  composée de deux feuillettes  $\beta$  centraux et cinq hélices  $\alpha$  périphériques, les structures tertiaires de neuf MBLs dont six de la sous-classe B1, un de la sous-classe B2 et deux de la sous-classe B3, ont été étudiées par la méthode X-ray cristallographie. Toutes ces MBLs présentent la même structure tertiaire en sandwich (ou en pli) de type  $\alpha\beta/\beta\alpha$  qui est à titre indicatif complètement sans rapport avec celle des serine betalactamases. (**Dugal et Fernandez, 2011**)

La structure présente une symétrie double interne apportée par deux domaines indépendants reliés entre eux par une boucle de 8 résidus d'acides aminés (121 à 128), leur site actif se trouve dans le sillon peu profond à l'interface des deux domaines  $\alpha\beta$  (**Majiduddin et al., 2002**).

Toutes les structures de MBLs présentent un pli global similaire avec des feuillets et des hélices dans l'ordre suivant:  $\beta 1\beta 2\beta 3\beta 4$  ( $\beta 5$ )  $\alpha 1\beta 5$  ( $\beta 6$ )  $\alpha 2\beta 6$  ( $\beta 7$ )  $\alpha 3$  pour le domaine N-terminal et ( $\beta 7$ )  $\beta 8$   $\beta 9$   $\beta 10$   $\beta 11$   $\alpha 4$   $\beta 12$   $\alpha 5$  pour le domaine C-terminal (**Rossolini et Docquier, 2007**).

La structure quaternaire de la plupart des MBLs est monomérique. À notre connaissance, la seule MBL qui fait l'exception à cette règle est la L1, dont la structure quaternaire est homotétramérique (**Figure 11**). (**Rossolini et Docquier, 2007**); (**Hu et al., 2008**).



**Figure 11:** Structure tétramérique d'une MBL de rubans. Les ions zinc sont présentés comme des sphères grises (**Rossolini et Docquier, 2007**; **Hu et al., 2008**).

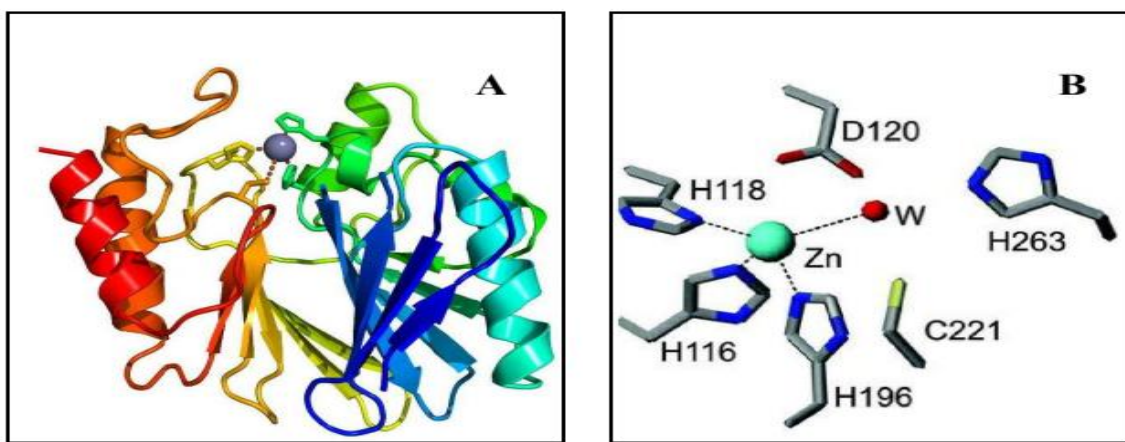
### II.3.2. Structure du site actif

Les Métallo- $\beta$ -lactamases possèdent généralement un site actif constitué de résidus d'acides aminés coordonnés à un ou à deux ions zinc. MBLs confondues, ces acides aminés sont fréquemment l'asparagine, la cystéine et trois à cinq histidines (**Zhang et al., 2013**).

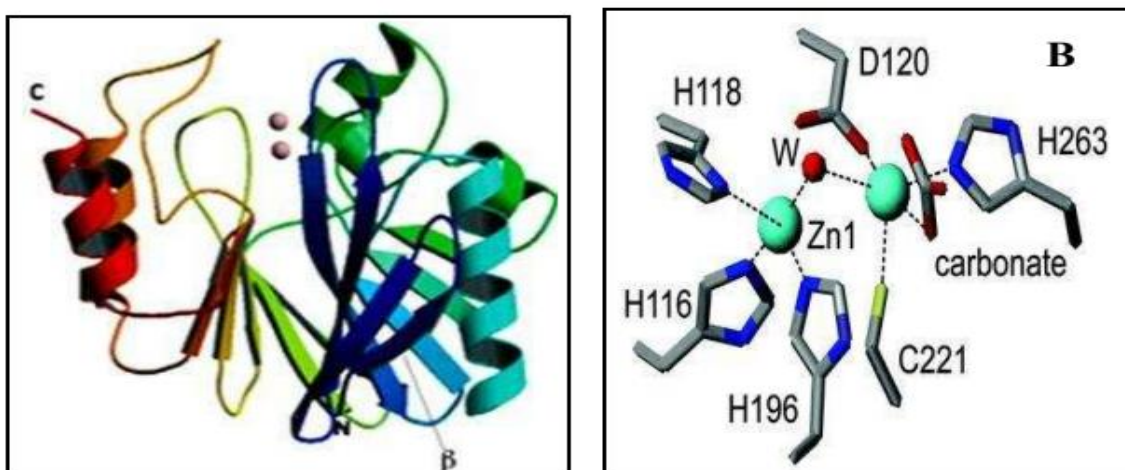
Dans la sous-classe B1, le site actif peut être mononucléaire, autrement dit les acides aminés établissent des liaisons avec un seul ion de zinc. Il peut être également bi-nucléaire, autrement dit les acides aminés établissent des liaisons avec deux ions de zinc. Dans le cas du site mono-nucléaire, les acides aminés établissant des liaisons avec le seul ion zinc sont trois résidus histidines (Figure. 12). 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 (Figure 13) (**Zhang et al., 2013**).

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. (**Zhang et al., 2013**).

Enfin, dans la classe B3, le site actif peut être mono ou bi-nucléaire. Dans le cas du site mono nucléaire, les acides aminés établissant des liaisons avec le seul ion zinc sont trois et sont des résidus histidines. Dans le cas du site bi-nucléaire les acides aminés établissant des liaisons avec le premier ion zinc sont trois ; avec le deuxième ion zinc sont des résidus d’histidine, de sérine et d’histidine, 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 histidines. 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 12:**(A): La structure reconstituée d’une métallo-beta-lactamase de la sous-classe B1, forme Mononucléaire (*Bacillus cereus* II); (B): schéma du site actif indiquant les acides aminés coordonnés à l’ion de zinc avec leur position (**Zhang et al.,2013**).



**Figure 13:** (A): La structure reconstituée d’une métallo-beta-lactamase de la sous-classe B1, forme bi-nucléaire (*Bacillus cereus* II); (B): schéma du site actif indiquant les acides aminés coordonnés au premier et au deuxième ion zinc avec leurs positions (**Zhang et al.,2013**).

**Tableau 1:** les résidus d'acides aminés du site actif des trois sous-classes MBLs coordonnés avec les ions de zinc (Zhang et al., 2013).

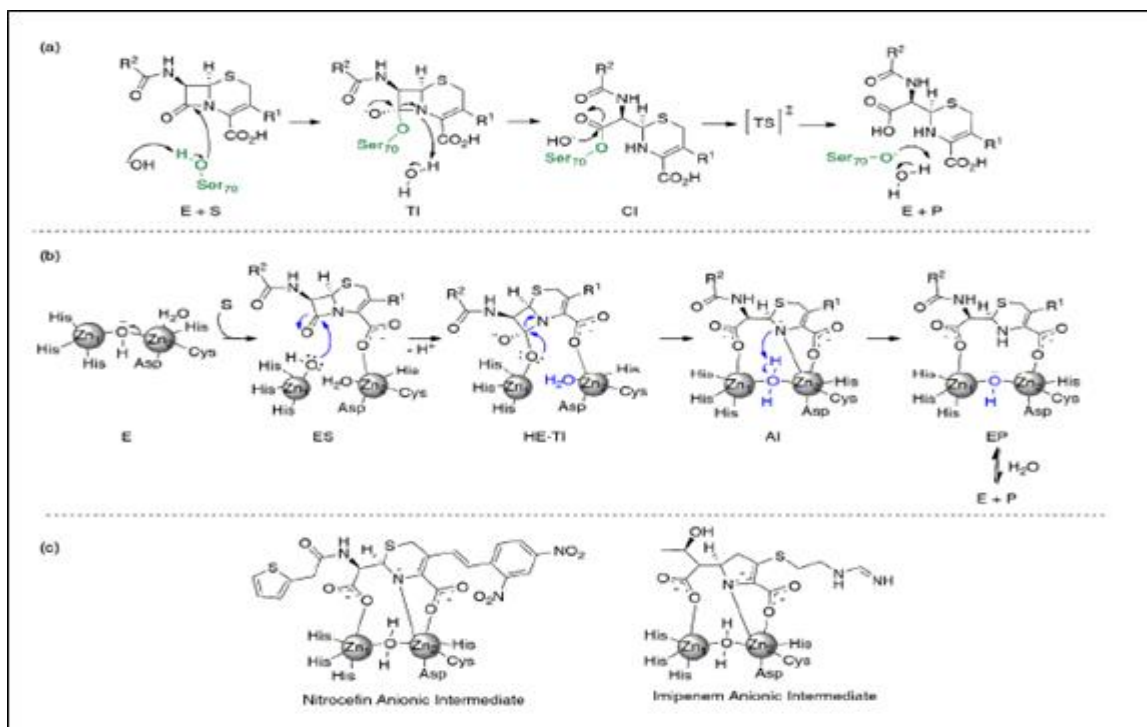
B-lactamases	Les ligands Zn1			Les ligands Zn2		
<b>Sous classe B1</b>						
<b>Consensus</b>						
<b>BBL*</b>	<b>His116</b>	<b>His118</b>	<b>His196</b>	<b>Asp120</b>	<b>Cys221</b>	<b>His263</b>
Bc II	His86	His88	His149	Asp90	Cys168	His210
IMP-1	His77	His79	His139	Asp81	Cys158	His197
CcrA	His99	His101	His162	Asp103	Cys181	His223
VIM-1	His88	His90	His153	Asp92	Cys172	His214
BlaB	His76	His78	His139	Asp80	Cys158	His200
IND-1	His96	His98	His159	Asp100	Cys178	His220
<b>Sous classe B2</b>						
<b>Consensus BBL</b>	<b>Asn116</b>	<b>His118</b>	<b>His196</b>	<b>Asp120</b>	<b>Cys221</b>	<b>His263</b>
CphA	Asn69	His71	His148	Asp73	Cys167	His205
Sfh-1	Asn72	His74	His151	Asp76	Cys170	His212
<b>Sous classe B3</b>						
<b>Consensus BBL</b>	<b>His/Gln116</b>	<b>His118</b>	<b>His196</b>	<b>Asp120</b>	<b>His121</b>	<b>His263</b>
L1	His84	His86	His160	Asp88	Cys89	His225
FEZ-1	His71	His73	His149	Asp75	Cys76	His215
GOB-1	Gln80	His82	His157	Asp84	Cys85	His213
THIN-B	His105	His107	His185	Asp109	Cys110	His253

#### II.4. Mécanisme d'action des Métallo-béta-lactamases

Les premières propositions pour le mécanisme de réaction des MBL ont été inspirées par le mécanisme des SBL. Cependant, l'absence du résidu Ser catalytique et du trou d'oxyanion rend impossible l'extrapoler ce mécanisme aux MBL; Actuellement, il est largement admis qu'il existe deux principales étapes de la réaction qui ont été détectées expérimentalement : l'attaque nucléophile de la carbonyle et la protonation de l'atome N (Figure 8b). Néanmoins, au sein de ce général schéma, il y a eu plusieurs questions controversées telles que l'accumulation de réaction intermédiaires, l'identité du nucléophile et du donneur de proton, et la spécificité fonction de chaque ion métallique au cours du processus. (Palacios et al., 2020).

L'activation nucléophile, la stabilisation des différentes espèces formées au cours de la mécanisme, et le positionnement du donneur de protons dépendent fortement de ces ions métalliques (Figure 8b). Dans les hydrolases Zn(II) (comme la glyoxalase II, l'anhydrase carbonique et la carboxypeptidase A) l'ion métallique abaisse le pKa d'une molécule d'eau liée, provoquant ainsi un hydroxyde fonctionnel groupe dans le site actif, favorisant l'attaque nucléophile. Pour les MBL B1 et B3, il a été proposé que Zn1 accomplit une fonction similaire. Cependant, comme Zn1 est absent des MBL B2, Zn2 est la seule caractéristique structurale

conservée dans tous les MBL et joue un rôle essentiel dans le positionnement et stabilisant différentes espèces au cours de la réaction, Malgré les différences structurales, il existe plusieurs caractéristiques communes du mécanisme de réaction des MBL des trois sous-classes (Figure 8b). Lors de la liaison au substrat, le complexe de Michaelis implique des interactions avec le site métallique et les résidus environnants. L'attaque nucléophile est produite par une molécule eau/hydroxyde activée par liaison à l'ion métallique (B1 et B3) ou par interactions de liaison hydrogène (B2). (Palacios et al.,2020).



**Figure 14:** Mécanisme de réaction des sérine-β-lactamases (SBL) et des MBL.

Mécanismes réactionnels généraux pour l'hydrolyse des céphalosporines par (a) les SBL et (b) les MBL. (c) Intermédiaires de réaction formés au cours hydrolyse de la nitrocéfine et de l'imipénème par les MBL. Les abréviations suivantes ont été utilisées : Enzyme (E), substrat (S), intermédiaire tétraédrique (TI), intermédiaire covalent (CI), produit (P), Enzyme : complexe de substrat (ES), intermédiaire tétraédrique à haute énergie (HE-TI), anionique Intermédiaire (AI) et Enzyme: Complexe Produit (EP) (Palacios et al., 2020).

## II. 5. Souches productrices des métallo-β-lactamases chez les entérobactéries

Les bactéries désignent des organismes cellulaires simples, dépourvus de chlorophylle, et visibles uniquement au microscope. Elles sont des éléments, qui n'appartiennent ni au règne végétal, ni au règne animal et qui d'habitude trouvées en très grand nombre parce qu'ils peuvent se multiplier rapidement, Ce sont des procaryotes: leur ADN est contenu dans un seul



chromosome qui n'est pas contenu dans un noyau. Les trois formes basiques, toutes présentes dans le sol, sont les coques (sphériques ou de forme ovale), les bacilles (en forme de bâtonnet) et les bactéries de forme spiralée. Pour l'essentiel, la bactérie se reproduit par division cellulaire, c'est-à-dire qu'une cellule se sépare en deux et donne deux cellules qui elles-mêmes se diviseront et ainsi de suite, bactéries pathogènes spécifiques désignent des germes qui déclenchent une infection caractéristique chez un sujet sain (**Bruyère et al., 2008**).

Les entérobactéries sont des bactéries commensales de la flore digestive mais qui peuvent être responsables d'infections graves. Les  $\beta$ -lactamases ayant une activité de carbapénèmase sont les plus puissants mécanismes de résistance aux carbapénèmes. Ces carbapénèmases sont identifiées de façon croissante chez les entérobactéries dans le monde entier. Les carbapénèmases de type KPC décrites tout d'abord aux États-Unis chez *Klebsiella pneumoniae* ont maintenant une diffusion mondiale. Les carbapénèmases de type métallo-enzymes (VIM, IMP...) ont été également décrites dans le monde entier avec une forte prévalence en Europe du Sud et en Asie. OXA-48 est l'une des carbapénèmases les plus récemment décrites, structurellement différente des précédentes et essentiellement identifiée dans des pays méditerranéens. (**Messadi, 2019**)

Les gènes de ces carbapénèmases sont le plus souvent plasmidiques, majoritairement dans des souches hospitalières de *Klebsiella pneumoniae* mais leur diffusion communautaire a déjà été rapportée. Ces carbapénèmases sont présentes dans des souches multirésistantes aux antibiotiques. Les infections à entérobactéries productrices de carbapénèmases sont difficiles à traiter et peuvent être la source d'impasses thérapeutiques. Leur détection difficile (détection des infectés comme des porteurs), expliquerait leur diffusion à bas bruit aux conséquences thérapeutiques dramatiques (**Fernandez, 2018**)

**Les bactéries à Gram Négatif :** Les bacilles à Gram négatif ont manifesté vis-à-vis des antibiotiques un pouvoir d'adaptation de plus en plus grand qui a abouti à des problèmes thérapeutiques encore aigus. Les bactéries à Gram négatif ont une structure biomembrane qui est organisée en trois grandes parties: La membrane externe, L'espace périplasmique (comportant notamment la paroi avec le peptidoglycane) et La membrane plasmique qui est presque pareil que la membrane externe. Les bacilles à Gram négatif hôtes naturels de l'intestin et de l'environnement sont responsables d'infections urinaires (**Prescott et al., 1995**).

La méthode de dilution La méthode par dilution a pour but d'évaluer des concentrations minimales inhibitrice (CMI). Elle consiste à déterminer la plus faible concentration d'un agent

antimicrobien, nécessaire pour inhiber la croissance d'un microorganisme (Oussou et al., 2008); (Derwich et al., 2010).

## II.6. Les inhibiteurs des MBL

Des combinaisons lactame/inhibiteur de lactamase/adjuvant ont été développées et sont utilisés en clinique pour le traitement des infections causées par les SBL, tandis que d'autres sont en cours d'essais cliniques. Ces molécules ne parviennent pas à inhiber les MBL, nécessitant ainsi de toute urgence le développement d'inhibiteurs ciblant les métallo enzymes bactériennes. Dans les régions où la prolifération des CRE MBL-positives augmente, l'acide clavulanique, le sulbactam, le tazobactam et l'avibactam, qui sont tous des inhibiteurs de la sérine-lactamase en usage clinique, n'apportent pas beaucoup d'avantages. Une approche pour surmonter les effets des MBL consiste à concevoir des inhibiteurs spécifiques qui peuvent être co-administrés avec antibiotiques lactames. Le défi général dans l'identification et le développement de MBLI à large spectre découle des différences structurelles et mécaniques au sein des trois sous-classes de MBL. Les groupes MBLI signalés comprennent les dérivés de thiol et de thioester, les tétrazoles et les hydroxamates, les dérivés d'acide sulfonique, les dérivés d'analogues  $\beta$ -lactame, les inhibiteurs à base de pyrroles, les dicarboxylates de pyridine, peptides produits naturels, acide nucléique et chélateurs de métaux (Somboro et al., 2018).

### II.6.1. Dérivés du thioester, du thiol et du captopril

Les thiols et les thiolcarboxylates sont largement considérés comme des MBLI. En 1997, Goto et al. ont rapporté que les esters de thiol acide 2-mercaptopropionique et acide mercaptoacétique sont parmi les nombreuses molécules de thiol qui inhibent fortement et de manière compétitive IMP-1, une sous-classe B1 MBL. Payne et al. ont également démontré qu'une série de dérivés d'ester de thiol d'acide mercaptoacétique inactivent l'activité catalytique des MBL de classe B telles que BcII, CFIa, L-1 et CphA. L'analyse par spectrométrie de masse a révélé que les esters de thiols inhibent les MBL en formant une liaison disulfure avec le site actif des enzymes. L'acide thiomandélique et ses dérivés se sont également avérés être des MBLI à large spectre. Lors de la constitution d'une bibliothèque d'analogues de l'acide thiomandélique, Mollard et ces collègues ont conclu que les thiols avec une fraction carboxylique amélioreraient l'efficacité des composés, tandis que le groupe thiol restait essentiel pour l'effet inhibiteur. Cela a été révélé par la substitution du groupe thiol par une fonction bromo, hydroxyle ou amidoxime, et il a été constaté que les analogues de l'acide thiomandélique n'ont pas réussi à inhiber l'activité de la MBL BcII (Somboro et al., 2018).

### II.6.2. Dérivés de dicarboxylate, d'acide carboxylique et d'hydroxamate

Le ME1071, un dérivé de l'acide maléique découvert par Meiji SeikaKaisha Ltd. (Tokyo, Japon) en tant que MBLI nouveau et spécifique, a été évalué in vitro en 2010 par Ishii et al. Pour déterminer sa capacité à potentialiser l'activité du biapénème et de la ceftazidime contre les producteurs de MBL IMP-1 et VIM-2 des souches de *Pseudomonas aeruginosa* (Somboro et al., 2018).

Des études ont également montré la capacité potentielle de l'acide hydroxamique à inactiver les ions zinc catalytiquement essentiels de la matrice métalloprotéase se liant au squelette peptidique, ce qui en fait des MBLI potentiels. L'analogique (R)-2-phényl-4,5-dihydrothiazole-4-l'acide carboxylique était le meilleur composé du groupe, inhibant IMP-1 avec un IC<sub>50</sub> de 5,5 M, et était encore plus actif que l'acide 2-benzylthiazole-4-carboxylique. Les boronates cycliques sont des inhibiteurs à large spectre des lactamases qui agissent à la fois contre les lactamases à base de sérine et de zinc et contre les protéines cibles de liaison à la pénicilline (PBP). Ce groupe d'inhibiteurs s'est avéré actif contre les MBL de sous-classe B1, offrant une voie pour le développement d'inhibiteurs à double action ciblant à la fois les lactamases à base de sérine et de zinc, en plus de posséder une activité antimicrobienne en inhibant les PBP. (Somboro et al., 2018)

### II.6.3. Inhibiteurs à base de pyrrole

Des dérivés de pyrrole synthétisés ont été étudiés pour leurs propriétés inhibitrices contre IMP-1 MBL acquise dans *P. aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae*. Les interactions de ce groupe d'inhibiteurs avec les MBL ne sont pas encore bien établies, en partie à cause de l'absence de structures cristallines des dérivés enzyme-pyrrole. Des études de modélisation et d'amarrage du composé le plus puissant de la série des dérivés du pyrrole ont indiqué qu'ils se lient aux deux ions zinc via l'anion thiol, avec des distances soufre-métal de 2,2 pour le zinc(I) et 2 pour le zinc(II) (Somboro et al., 2018).

### II.6.4. Produits naturels

Les produits naturels ou métabolites jouent un rôle important dans la découverte des antimicrobiens. Divers composés de produits naturels ont présenté une bonne activité inhibitrice contre les MBL. Une série de produits tricycliques, SB238569, SB236050 et SB236049 de *Chaetomium funicola*, a montré un effet inhibiteur contre les enzymes CfiA, IMP-1 et BcII, avec SB2360449 comme composé principal. Ces molécules tricycliques ont montré une activité inhibitrice minimale ou nulle vis-à-vis de la conversion de l'angiotensine enzyme (ACE), qui est

une métalloenzyme de mammifère, prédisant ainsi leur spécificité pour les MBL de classe B. Les avonoïdesgalangine et quercétine de *Stenotrophomonas maltophilia* a inhibé de manière irréversible la L-1 MBL de *S. maltophilia*. Polycétides et dérivés de *Penicillium* spp. Ont également montré une activité contre l'enzyme NDM-1 de sous-classe B1 cliniquement pertinente. L'aspergillomarasmine A (AMA), un produit naturel et agent chélateur de métaux produit par un champignon, récemment identifié par King et al., a montré une capacité à inhiber les activités des enzymes de classe B1 VIM-2 et NDM-1. La capacité de ces produits naturels à éviter la séquestration des métalloenzymes humaines en ferait des adjuvants plus sûrs. Néanmoins, l'application systémique de produits naturels comme agents antimicrobiens a été limitée par la toxicité. **(Somboro et al., 2018).**

### ***Chapitre III.***

***Généralités sur deux plantes potentiellement inhibitrices de l'activité enzymatique des métallo-bêta-lactamase (Eucalyptus globulus et Syzygium aromaticum)***

---

### **III.1. Intérêt de l'étude des plantes médicinales**

La plupart des espèces végétales contiennent des substances qui peuvent agir, à un niveau ou un autre, sur l'organisme humain et animal. On les utilise aussi bien en médecine classique qu'en phytothérapie. Elles présentent en effet des avantages dont les médicaments sont souvent dépourvus (**Iserin, 2001**).

La raison fondamentale est que les principes actifs végétaux proviennent de processus biotiques répandus dans tout le monde vivant, alors que l'essentiel des médicaments de synthèse sont des xénobiotiques aux effets secondaires très mal maîtrisés (**Bruneton, 2009**).

Les plantes médicinales sont donc importantes pour la recherche pharmaceutique et l'élaboration des médicaments, directement comme agents thérapeutiques, mais aussi comme matière première pour la synthèse des médicaments ou comme modèle pour les composés pharmaceutiquement actifs (**Decaux, 2002**).

La phytothérapie qui repose sur des remèdes naturels est bien acceptée par l'organisme, et souvent associée aux traitements classiques. Elle connaît de nos jours un renouveau exceptionnel en occident, spécialement dans le traitement des maladies chroniques comme l'asthme ou l'arthrite (**Iserin P, 2008**).

### **III.2. Syzygium aromaticum**

#### **III.2.1. Description botanique**

*Syzygium aromaticum* est un grand arbre, d'une hauteur moyenne de 10 à 12 m, qui peut atteindre jusqu'à 20 m de haut, à port pyramidal et au tronc gris clair ridé. Ses feuilles, de 8 à 10 cm de long, il est toujours vert. L'*Eugenia aromatica* commence seulement à produire des **clous de girofle** (boutons floraux) à partir de l'âge de 20 ans, il est encore productif pendant une cinquantaine d'années. Le giroflier présente un port érigé et pyramidal, Son feuillage est aromatique, coriace, persistant vert sombre et vernissé au revers plus clair. Ses feuilles sont opposées, entières, elliptiques, d'environ 10-12 cm à nervure médian marquée et parsemées de glandes sur le revers. (**Akila, 2019**).



**Figure 15:** Arbre de Giroflier de Madagascar (Akila , 2019).



**Figure 16:** Fleur de giroflier . (Akila, 2019)



**Figure 17:** Aspect morphologique de giroflier (Akila, 2019)

### Chapitre III : Généralités sur deux plantes potentiellement inhibitrices de l'activité enzymatique des métallo-bêta-lactamase (*Eucalyptus globulus* et *Syzygium aromaticum*)

Les fleurs sont disposées en cymes terminales (Photo 2) de 25 fleurs environ, formant 3 fourches (figure 3). Elle se présente sous la forme d'un long pédoncule, petite fleur à l'extrémité des rameaux, à 4 pétales (blanc-rosé) pompon Duveteux d'étamines blanches saillantes, les fleurs à 4 pétales blanc rosé sont caractérisées par leurs sépales rouges persistants. Ce sont les boutons floraux cueillis avant épanouissement que l'on appelle les clous de girofle et l'huile essentielle qui est utilisée pour leurs vertus thérapeutiques ; Les fruits de girofle sont des baies pourpres comestibles. La récolte des clous de girofle se fait au moment où ils contiennent le plus d'essence (Lorsqu'ils sont roses et les pétales pas encore ouverts). Ces clous sont récoltés, après 6 à 8 ans de culture de l'arbre, 2 fois par an. Ce sont des boutons auxquels on ôte le pédicelle manuellement et que l'on met sécher au soleil jusqu'à ce qu'ils deviennent brun rouge Boutons floraux appelés « clous » (**Ghedira, 2010**).

Les racines, les rameaux, les feuilles les fleurs et les fruits contiennent tous une HE dont la composition diffère. Par exemple l'HE des feuilles contient seulement 2 à 3 % d'eugénol. L'huile essentielle de girofle provient de la distillation des boutons de girofle traités à la vapeur. (**Ghedira, 2010**).

#### **III.2.2. Noms similaires de *Syzygium aromaticum***

*Caryophyllus aromaticus*, *Eugenia aromatica*, *Eugenia caryophyllata*, *Eugenia caryophyllus* (**Ghedira, 2010**).

##### **III.2.2.1. Classification**

Règne: Plantae; Sous-règne: Trachéobionta; Division: Magnoliophyta ; Classe: Magnoliopsida; Sous-classe: Rosidae; Ordre: Myrtales; Famille: Myrtaceae; Genre: *Syzygium* ; Nom binomiale: *Syzygium aromaticum* (L) (**Ghedira, 2010**).



### III.2.2.1. Constituants chimiques du giroflier

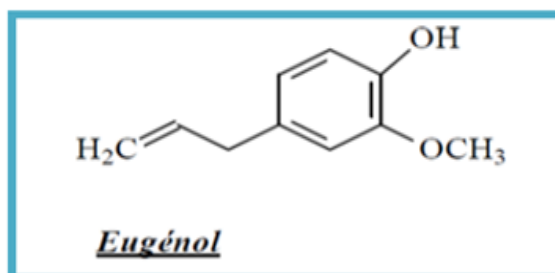
Le clou de girofle renferme une quantité importante d'huile essentielle 15 à 20%, 16% d'huile, des tanins, un peu d'amidon et des matières fibreuses cellulose. Le pédoncule floral (griffes) renferme 5 à 6% d'huile, dans les feuilles la quantité d'huile est de 3 à 4%. L'huile de girofle est très riche en eugénol de 70 à 85%. On trouve aussi d'autres composés terpéniques (dont environ 10 % caryophyllène), aliphatiques, aromatiques et hétérocycliques. (Ghedira 2020)

**Tableau 2:** Composition chimique de l'huile essentielle des clous de girofle. (Ghedira 2020)

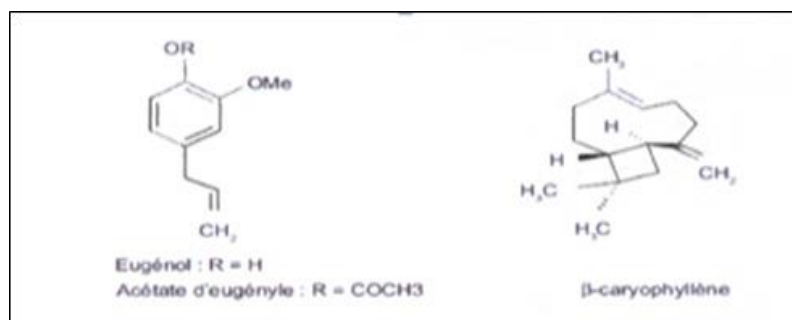
Constituants	Pourcentages
Eugénol	91,2
$\beta$ -caryophyllène	4,1
$\alpha$ -humulène	0,6
Eugényl acétate	2,9
$\beta$ -caryophyllène époxyde	0,5
Total	99,3%

### III.2.2.2. Les huiles essentielles

A une teneur exceptionnelle de 15 à 20%, dont l'eugénol est le composé majeur (85 à 95% de l'huile) ; acétate d'eugényl et  $\beta$ -caryophyllène (environ 10%) en petites quantités (Ghedira 2020).



**Figure 18:** Composé majeur de l'huile essentielle des clous de girofle. (Ghedira et al., 2010)



**Figure 19:** Structure chimique des trois composés des huiles essentielles. (Ghedira et al., 2010)

### III.3. Autres constituants

Flavonoïdes (dérivés du quercétol et kaempférol); tanins; acides carboxyphénoliques (acidesgallique); traces de stérols et d'hétérosides correspondants; environ 10% d'huile grasse ( **Bbushan et al, 2015**).

- **Usage traditionnelle et courant de clou de girofle**

Usage alimentaireClou de girofle a été utilisé dans la cuisine pendant des siècles comme conservateurs), aussi il est populairement utilisé dans la cuisine comme épice (**Kumaret a**

**l, 2011**)

Ancien remède universelLes clous de girofle sont, depuis des millénaires, utilisés en Asie du Sud-Est où ils sont considéréscomme un remède universel (**Iserin, 2001**).

Usage comme antiseptiqueGrâce à leurs propriétés antiseptiques, ils sont efficaces dans le traitement de certaines affectionsvirales. En Asie tropicale, ils furent souvent recommandés en cas de paludisme, de choléra et detuberculose, ou de parasites comme la gale (**Iserin, 2001**)

Usage comme antispasmodiqueLes clous de girofle soulagent les troubles digestifs, tels que flatulences et coliques. Ils apaisentaussi la toux et appliqués localement, les spasmes musculaires (**Perotto, 2013**).

Usage comme stimulant physique et intellectuel. Les clous de girofl e ont une action stimulante, aussi bien dans les cas d'asthénie intellectuelle (pertede mémoire) que corporelle considérés comme étant aphrodisiaque, ils stimulent et augmentent également les contractions de l'utérus lors de l'accouchement (**Iserin, 2001**).

Les clous de girofle sont efficaces en cas d'acné, d'ulcères cutanés, de plaies et d'orgelets Aux Moluques, on les pique dans des oranges pour tuer moustiques et mîtes (**Sultana et al, 2010**).

### III.4. Activité antibactérienne

L'activité inhibitrice du clou de girofle est due à la présence deplusieurs constituants, principalement l'eugénol, l'acétate d'eugényle, le -caryophyllène, le 2-heptanone, l'acétyl-eugénol, le  $\alpha$ -humulène, le salicylate de méthyle, l'iso-eugénol, le méthyleugénol,les phénylpropanoïdes, déhydrodieugénol, trans-confiréryl aldéhyde, biflorine,kaempférol, rhamnétine, myricétine, acide gallique, acide ellagique et acide oléanolique. Ces composés

peuvent dénaturer les protéines et réagir avec les phospholipides de la membranecellulaire, modifiant leur perméabilité. (Bhowmik et al, 2012).

On a trouvé que l'huile de clou de girofle était efficace contre les souches non toxigènes d' *E. coli* O157:H7. De même, dans une autre étude, l'huile de clou de girofle s'est révélée active contre les bactéries à Gram positif d'origine alimentaire (*S. aureus*, *B. cereus*, *E. faecalis*, *L. monocytogenes*) et les bactéries à Gram négatif (*E. coli*, *Y. enterocolitica*, *S. choleraesuis*, *P. aeruginosa*). Les extraits aqueux et éthanoliques de clous de girofle inhibent la croissance d'isolats cliniques résistants à la méthicilline à des concentrations de 1000 et 500 mg/ml. Les isolats étaient multi résistants aux médicaments, principalement contre les bêta-lactamines, les Aminosides, les tétracyclines, les fluoroquinolones et les antibiotiques macrolides. Dans une autre étude, l'eugénol à 2 g/mL a inhibé la croissance de 31 souches d'*Helicobacter pylori*, après 9heures d'incubation, qui est plus puissante que l'amoxicilline et ne développe pas de résistance (Bhowmik et al., 2012).

L'HE de *S. aromaticum* inhibe l'expression du gène pqs A chez *P. aeruginosa*. L'HE de *Syzygium aromaticum* pourrait éradiquer *Escherichia coli* en phase stationnaire à une faible concentration de 0,25% après une exposition de trois ou cinq jours L'HE de clou de girofle a un bon potentiel incorporée dans la pectine d'agrumes pour fabriquer des films ou des revêtem

ents comestibles antimicrobiens pour diverses applications alimentaires (ghedira et al., 2010).

**Activité antifongique:** les huiles essentielles de clou de girofle possèdent une activité puissante antifongique contre les pathogène fongique opportuniste, comme le *candidaalbicans* le *cryptococcusneoformans*ou *Aspergillus fumigatus*(Mittal et al ,2014).

**Antalgique (eugénol):** l'huile essentielle de Clou de Girofle contient de l'eugénol.

Cette molécule est plus puissante que la lidocaïne, un anesthésique local agissant sur la transmission des informations nerveuses. Autrement dit, l'eugénol bloque la transmission de la douleur.L'huile essentielle est notamment efficace contre les douleurs dentaires.(Chagra,2019).

**Anti-inflammatoire:** l'huile de clou de girofle clarifie le voies respiratoires, agissant comme un expectorant pour le traitement de nombreuses affections des voies respiratoires supérieures y compris le rhume, les orgelets, la bronchite, les sinus maladies, toux et asthme (Bhowmik et al, 2012).

### **III.5. Effet hépatique et antioxydant**

Chez 160 poules pondeuses, avec privation d'oméga 3 et 6, l'augmentation de la teneur en clous de girofle a entraîné une réduction ( $p < 0,01$ ) du poids relatif du foie ( $p < 0,05$ ) et du nombre de vacuoles de la graisse hépatique. En général, les meilleures réponses synergiques sur la modulation des lipides sanguins et des activités enzymatiques sériques ont été observées lorsque le plus haut niveau de bourgeon de clou de girofle a été complété dans les régimes avec un faible rapport n-6 à n-3. De même, les indices antioxydants ont été améliorés par l'administration de poudre de clou de girofle alimentaire, bien que l'on ait observé que l'alimentation en huile de poisson augmentait la sensibilité du sang et des hépatocytes à la peroxydation lipidique. (Ghedira et al,2010).

L'HE de clou de girofle présente une activité antioxydante importante dans les lipides. L'HE de clou de girofle face contre les dommages des radicaux libres causés par les aflatoxines, qui sont des mycotoxines potentiellement mutagènes, cancérigènes, hépatotoxiques et tératogènes. (Ghedira et al,2010)

**Activité antidiabétique:** L'inhibition des activités de l' $\alpha$ -amylase et de l' $\alpha$ -glucosidase, l'inhibition de la peroxydation lipidique induite par les pro-oxydants dans le pancréas de rat et les activités anti

oxydantes pourraient être des mécanismes possibles pour l'utilisation de l'huile essentielle dans la gestion et la prévention du diabète de type 2 induit par le stress oxydatif. (Ghedira et al,2010).

#### **III.5.1. Effet anticancéreux**

L'HE de *S. aromaticum* entraîne l'apoptose et la réduction de la prolifération des cellules cancéreuses, faisant de la formulation un candidat prometteur comme médicament anticancéreux alternatif. (Ghedira et al., 2010).

#### **III.5.2. Effet sur les termites**

Cinq composés de deux huiles essentielles de *S. aromaticum* et d'ail ont été testés individuellement pour leurs activités insecticides contre les termites japonais. Les réponses variaient selon le composé et la dose. Le trisulfure de diallyle était le plus toxique, suivi du disulfure de diallyle, de l'eugénol, du sulfure de diallyle et du  $\beta$ -caryophyllène. (Ghedira et al., 2010).

### **III.5.3. Effet sur la maladie de Lyme**

L'HE de *S. aromaticum* et les huiles essentielles d'origan, d'écorce de cannelle, de citronnelle et de gaulthérie, à faible concentration (0,25%), montrent une activité antipersistance élevée qui est plus active que le médicament persistant connu, la daptomycine. (Ghedira et al,2010).

- **Activité anticarie**

L'HE de *S. aromaticum* a une activité contre les bactéries cariogènes et l'effet antibactérien de l'huile essentielle totale est plus importante que celle du  $\beta$ -caryophyllène et semblable à celle de l'eugénol. L'association HE de *S. aromaticum* et ampicilline ou gentamicine se potentialisent. (Ghedira et al,2010).

- **Forme et dosage**

L'HE de *S. aromaticum* s'utilise en solution avec huile végétale comestible, alcool 90° ou macérat glyciné à 2 à 3 % Dosage : 1 goutte sur un comprimé sec, trois par jour ou 45 gouttes d'HE en solution. (Ghedira et al,2010).

Avec un excipient sec comme le lactose Ou en huile essentielle pure. Ou encore en fumigation en aérosol.

En aromatisation de certaines denrées pour lesquelles elle a un effet stérilisant.

L'application de l'HE directement sur la peau ou la muqueuse entraîne une sensation de brûlure puis un effet analgésique. (Ghedira et al,2010).

Sphère bucco-dentaire 1 à 2 gouttes d'huile essentielle pure sur une ouate au contact de la dent. Solutions à 15 % d'huile essentielle de clou de girofle pour bain de bouche Dose en usage interne: 1 goutte sur un comprimé neutre, 2 à 3 fois par jour. (Ghedira et al,2010)

### **III.5.4. Effet interactif**

Elle peut contenir du méthyleugénol, peut inhiber la coagulation du sang, embryotoxicité, sensibilisation cutanée (risque modéré), irritation des muqueuses (risque modéré). Précautions (par voie orale): L'HE de *S. aromaticum* peut interagir avec la péthidine, les IMAO ou les ISRS, les médicaments anticoagulants, chirurgie majeure, ulcère gastroduodéal, hémophilie, autres troubles de la coagulation. (Ghedira et al,2010).

### III.5.5. Effets indésirables de clou de girofle

L'utilisation de l'huile essentielle de girofle sous forme concentrée, irrite les tissus, aussi une réaction allergique est signalée chez les sujets exposés régulièrement aux fleurs du giroflier ou ayant au préalable une dermatite au niveau de l'extrémité des doigts. L'huile essentielle doit être évitée pendant la grossesse et chez l'enfant de moins de 6 ans (**Goetz et Ghedira, 2012**).

### III.6. *Eucalyptus globulus*

*Eucalyptus globulus* appartient à la famille des Myrtaceae. Cette espèce est originaire de Tasmanie en Australie, elle est donc indigène au continent australien. *Eucalyptus globulus* a été introduit en France en 1804 à la commune de Malmaison (région de Picardie). Elle est acclimatée dans les pays du Maghreb, en France méridionale, en Espagne, au Portugal, en Italie et en Amérique. L'*Eucalyptus globulus* pousse surtout dans les régions chaudes. (**Lobstein, 2018**)

Son introduction en Algérie est faite et leur facilité d'adaptation permet une plantation massive, parmi les espèces les plus répons dans la région méditerranéenne *Eucalyptus globulus*, *Eucalyptus camaldulensis*, *Eucalyptus gomphocephala*, le transfert génétique entre certaines espèces se fait rapidement et cela complique encore plus leur identification (**Ghenaiet et Aouidet, 2016**).

Les propriétés remarquables d'*Eucalyptus globulus* sont appréciées à leur valeur, et on se préoccupe d'en tirer parti, non seulement pour la thérapeutique, mais encore pour l'assainissement des pays marécageux (**Lobstein, 2018**).

- **Description botanique**

L'*Eucalyptus globulus* mesure 30 à 60 mètres de haut mais peut parfois atteindre 100 mètres. Son tronc est lisse et sa couleur varie du blanc au gris. Son écorce se détache facilement, en longues bandes. Les jeunes feuilles sont cireuses, ovales, claires, opposées et sessiles. Mais ce sont les feuilles poussant sur les vieilles branches qui sont officinales car ce sont les seules à posséder des poches à essences sur la face inférieure. Elles peuvent atteindre 25 centimètres de long, sont falciformes, alternes, pétiolées, de couleur gris-vert et possèdent une nervure principale. La plante coupée est reconnaissable par la présence de nombreuses poches sécrétrices sur la face inférieure de la feuille. Les fleurs, visibles au printemps, naissent à l'aisselle des feuilles. Le calice a la forme d'une toupie bosselée dont la partie large est couverte par un opercule qui se détache au moment de la floraison, laissant

Chapitre III : Généralités sur deux plantes potentiellement inhibitrices de l'activité enzymatique des métallo-bêta-lactamase (*Eucalyptus globulus* et *Syzygium aromaticum*)  
apparaître de nombreuses étamines. Le fruit, qui est la capsule anguleuse du calice, renferme deux types de graines (Lobstein, 2018).



Figure 20: Illustration des feuilles et fruits d'*Eucalyptus globulus* (Lobstein, 2018)



Figure 21: arbre de *eucalptusglobulus* (Lobstein, 2018)

### III.7. Taxonomie botanique de l'espèce *Eucalyptus globulus* est la suivante

- ❖ Règne: Plantae
- ❖ Division: Magnoliophyta
- ❖ Sous-règne: Tracheobionta
- ❖ Classe: Magnoliopsida
- ❖ Sous-classe: Rosidae
- ❖ Ordre: Myrtales
- ❖ Famille: Myrtaceae

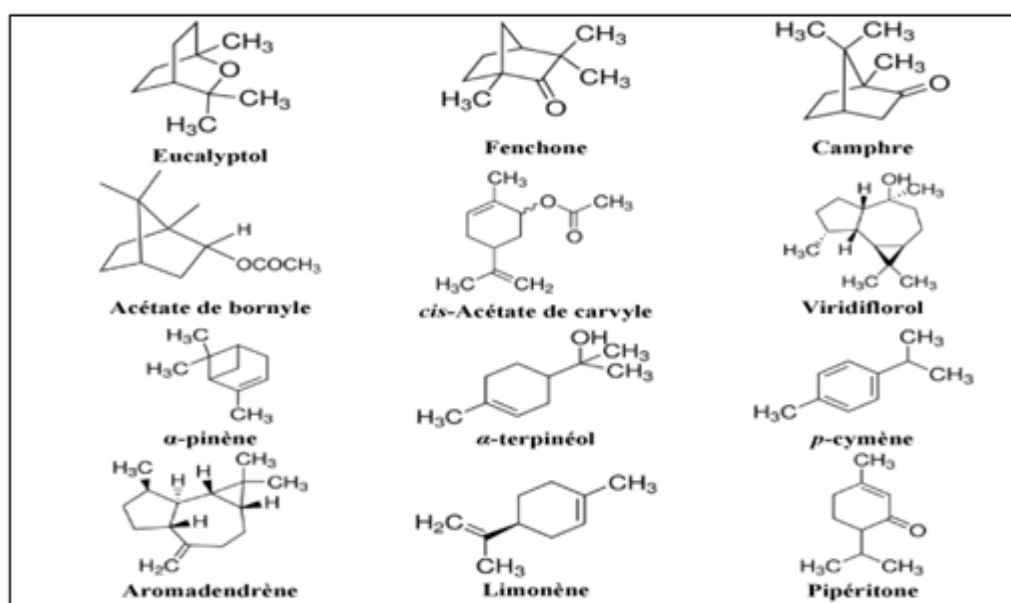
❖ **Genre:** *Eucalyptus*

❖ **Espèce:** *Eucalyptus globulus* (Labill). (**Boukhatem, 2017**)

### III.8. Composition chimique

L'essence d'eucalyptus est extraite par entraînement à la vapeur d'eau des feuilles sèches (adultes plus riches en huile) ou encore des tiges terminales fraîches. Le rendement de l'opération d'extraction de l'HE varie de 1 à 3 %. Il existe plusieurs variétés d'eucalyptus, et toutes ne possèdent pas les mêmes composants. Cependant, il y a certains composants qui sont présents dans la majorité des cas, et ceux-ci sont bien souvent ceux qui sont à l'origine des bienfaits thérapeutiques que l'on attribue à l'eucalyptus. Parmi ces composés, le 1,8-cinéole ou eucalyptol (70 à 80 %) (Fig. 3) est sans doute le plus connu, car il est un expectorant, peut soulager la toux et lutter contre les problèmes des voies respiratoires. Les autres constituants de cette HE sont très divers, nombreux et minoritaires. Pinène, limonène, et au moins 250 autres composés, dont citronellal, cryptone, pipéritone (**Boukhatem, 2017**)

Cette variabilité dépend des périodes de la récolte (estivale ou hivernale) des plantes à parfum, des caractéristiques du climat et particulièrement de la température, de la durée d'ensoleillement, de la pluviométrie, de l'altitude et de la nature de sol. En outre, la composition chimique d'une HE est tributaire de plusieurs facteurs, biotique et abiotique. Plusieurs études ont été faites dans ce sens dans le but de justifier les fluctuations qui ont été observées dans le tracé chromatographique de cet arbre à parfum (tableau 1) (**Boukhatem, 2017**)



**Figure 22:** Structure chimique de quelques composés détectés dans l'essence d'*Eucalyptus globulus* (**Boukhatem, 2017**).



**Tableau 3:** Composition chimique de l'essence d'*Eucalyptus globulus* de plusieurs pays (Boukhatem, 2017)

Tableau 1 Composition chimique de l'essence d' <i>Eucalyptus globulus</i> provenant de plusieurs pays								
Abondance relative (%)								
Auteurs (année)	Mulyaningsih et al. (2010) [13]	Goldbeck et al. (2014) [14]	Vilela et al. (2009) [15]	Elaissi et al. (2012) [16]	Manika et al. (2013) [17]	Kumar et al. (2012) [18]	Tyagi et Malik (2011) [19]	Boukhatem et al. (2014) [20]
Pays	Allemagne	Brésil	Brésil	Tunisie	Inde	Inde	Inde	Algérie
Composés								
$\alpha$ -pinène	1,53	8,30	–	12,0	1,2	–	4,2	24,6
$\beta$ -myrcène	–	–	0,49	–	0,1	1,88	1,5	–
$\alpha$ -phellandrène	2,61	–	–	–	–	0,93	1,3	–
Limonène	–	–	–	2,3	–	10,09	17,8	–
<i>p</i> -cymène	0,49	1,79	–	1,0	–	–	9,5	–
<b>1,8-cinéole</b>	<b>14,55</b>	<b>71,05</b>	<b>89,95</b>	<b>53,7</b>	<b>63,7</b>	<b>33,62</b>	<b>45,4</b>	<b>51,08</b>
$\gamma$ -terpinène	0,18	–	0,25	–	0,8	2,92	8,8	–
Linalool	0,12	–	–	–	0,3	2,34	0,5	–
Pinocarvone	–	0,75	0,30	1,7	–	–	0,4	9,98
Bornéol	0,41	–	–	–	–	–	0,1	0,34
Terpinène-4-ol	1,87	–	0,72	–	1,4	2,42	1,4	0,17
$\alpha$ -terpinéol	0,85	0,79	0,62	3,3	0,9	4,72	3,6	0,4
Géraniol	Trace	–	–	–	0,3	0,24	0,1	–
<b>Aromadendrène</b>	<b>31,17</b>	–	–	3,7	13,5	–	–	–
Viridiflorol	0,24	–	–	1,7	–	–	–	–
Globulol	10,69	3,51	–	7,0	3,4	–	–	2,81
– : non détecté. Les composés en gras ont été retrouvés comme majoritaires dans l'huile essentielle								

### III.9. Les activités biologiques d'*Eucalyptus globulus*

#### III.9.1. Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des huiles essentielles à une relation étroite avec sa composition chimique (Chemloul, 2014) par exemple grâce à la présence de 1-8 cineol, l'huile essentielle d'*eucalyptus* va être douée de propriété antibactérienne et cicatrisante. (Lasгаа, 2021).

Le mode d'action des HE sur les cellules bactériennes a été bel et bien élucidé. Compte tenu de la diversité des molécules présentes dans les huiles, l'activité antibactérienne semble résulter d'une combinaison de plusieurs modes d'action, impliquant différentes cibles cellulaires. De façon générale, il a été observé une div

ersité d'actions toxiques des

HE sur les bactéries comme la perturbation de la membrane cytoplasmique, la perturbation de la force motrice de proton, la fuite d'électron et la coagulation du contenu protéique des cellules. (Boukhatem, 2018).

**Tableau 4:** Activité antibactérienne de l'essence aromatique des espèces du genre *Eucalyptus globulus* déterminée in vitro par la méthode de diffusion en milieu gélosé (aromatogramme) (**Boukhatem, 2018**)

Tableau 2 Activité antibactérienne de l'essence aromatique des espèces du genre <i>Eucalyptus</i> déterminée in vitro par la méthode de diffusion en milieu gélosé (aromatogramme)								
Auteurs (année)	Deans et Ritchie (1987) [33]	Pattnaik et al. (1997) [30]	Cimanga et al. (2002) [24]	Prabuseenivasan et al. (2006) [34]	Đakov (2011) [31]	Elaissi et al. (2012) [16]	Proenza et al. (2013) [32]	Boukhatem et al. (2014) [20]
Pays	Grande-Bretagne	Inde	Congo	Inde	Serbie	Tunisie	Cuba	Algérie
<b>Bactéries à Gram+</b>								
<i>Staphylococcus aureus</i>	00 <sup>a</sup>	12	00	00	27	9	23	15–69
<i>Bacillus subtilis</i>	7,5	–	21	00	–	–	22	15–75
<i>Enterococcus faecalis</i>	00	–	–	–	–	8,7	–	–
<i>Streptococcus pyogenes</i>	–	–	–	–	28	–	–	–
<b>Bactéries à Gram–</b>								
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	00	20	9,5	00	12	8,7	10	00
<i>Escherichia coli</i>	00	20	15	8,5	28	8	10	15–42
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	00	15	16,5	00	28	–	–	13–18
<i>Acinetobacter baumannii</i>	–	–	–	–	25	–	–	14–26
<i>Proteus mirabilis</i>	00	–	00	00	24	–	–	12–27
<i>Citrobacter freundii</i>	–	15	7	–	29	–	–	11–15
– : non déterminé								
<sup>a</sup> Diamètre des zones d'inhibition (DZI) en millimètre (diamètre du disque [6 mm] n'a pas été inclus)								

### III.9.2. Activité antifongique

Le pouvoir antiseptique de certaines l'huile essentielle est active également sur les champignons responsables de mycoses et les levures (*Candida albican*) (**Lasgaa, 2021**).

Ils ont démontré que le mode d'action de la vapeur réside dans la déformation morphologique et la rupture de la membrane cellulaire. Par conséquent, ces altérations réduisent l'aptitude d'adhérence des cellules fongiques et donc la réduction de leur virulence. (**Boukhatem, 2018**). Cette activité est due à la présence de certaines fonctions chimique principalement les phénols qui sont plus antifongique que les aldéhydes (**Lasgaa, 2021**).

### III.9.3. Activité antivirale

Les infections virales font parties des pathologies les plus dangereux et les plus variées qui peuvent être mortelles dans plusieurs cas, les huiles essentielles présentent une thérapie naturelle qui limitent leurs propagations puisque les virus sont sensibles aux molécules aromatiques, donc les huiles essentielles constituent une opportunité pour traiter ces fléaux infectieux (**Bessedik, 2015**).

#### **III.9.4. Activité antiparasitaire**

Les groupements phénoliques sont les composés antiparasitaires les plus puissants suivis par les alcools monoterpéniques certains oxydes et cétones ont ainsi une activité antiparasitaire (**Bessedik, 2015**).

#### **III.9.5. Bronchite chronique**

Un essai clinique mené auprès de 242 sujets atteints de maladie pulmonaire obstructive chronique a démontré que la prise de 1,8-cinéole (200 mg, trois fois par jour) durant six mois a réduit la fréquence et la durée des exacerbations plus efficacement qu'un placebo. Tous les sujets recevaient en parallèle leur traitement médical standard. Asthme Dans l'étude publiée par Juergens et al., il est suggéré que l'eucalyptol, un des ingrédients de l'huile d'eucalyptus, possède des propriétés mucolytiques permettant de fluidifier le mucus des voies respiratoires, et pourrait ainsi être utilisé en complément de stéroïdes dans le traitement de l'asthme d'intensité sévère. Des études réalisées chez l'animal indiquent que ses effets bénéfiques contre l'asthme s'expliqueraient par ses propriétés anti-inflammatoires, en particulier sa capacité de diminuer la production des molécules responsables de l'inflammation et appelées cytokines. (**Meyer, 2016**).

Infections et inflammations des voies respiratoires Au cours de trois essais cliniques, le 1,8-cinéole que contient l'eucalyptus s'est révélé efficace pour réduire la dose de corticostéroïdes utilisée par des sujets souffrant d'asthme et pour combattre le rhume. (**Meyer, 2016**).

#### **III.9.6. Action analgésique**

Les études sur les humains manquent pour confirmer l'efficacité de l'eucalyptus pour combattre l'inflammation et la douleur qui en découle. Des essais sur des souris ont cependant permis d'observer que l'eucalyptus exerce une activité antidouleur. On pense généralement que cette activité serait attribuable aux propriétés antioxydantes de la plante. De plus, une étude préliminaire suggère qu'une combinaison d'huiles, incluant celle de l'eucalyptus, pourrait diminuer la sensation de douleur et les symptômes dépressifs chez des patients souffrant d'arthrite. (**Meyer, 2016**).

#### **III.9.7. Hygiène buccale**

Des données préliminaires ont établi que l'eucalyptus peut combattre la plaque dentaire et les bactéries qui la causent. Des dentifrices et des rince-bouches renfermant de l'HE d'eucalyptus ont donné des résultats bénéfiques au cours d'essais cliniques portant sur

l'hygiène buccale (plaque dentaire, gingivite). Ces produits (Listerine® et génériques) contiennent généralement aussi du thymol et du menthol. **(Meyer, 2016).**

Au cours d'un essai publié en 2008, 97 sujets souffrant de gingivite modérée ont consommé de la gomme à mâcher contenant un extrait d'eucalyptus (0,4 %) ou un placebo, cinq fois par jour, durant 12 semaines : la gomme à mâcher à l'extrait d'eucalyptus, quelle que soit sa concentration, a été plus efficace que celle renfermant un placebo pour améliorer la santé des gencives des participants. **(Meyer, 2016).**

### **III.9.8. Insectifuge**

L'HE d'eucalyptus est un remède traditionnel pour éloigner les insectes piqueurs [68]. Au cours d'une étude croisée menée en Suède, un insectifuge à base d'eucalyptus (Citriodiol) a réduit de moitié les morsures de tiques subies par 111 participants à des activités de plein air. Au cours d'un essai effectué en Malaisie, un produit à base d'eucalyptus a été très efficace pour prévenir les morsures de sangsues. En somme, plusieurs travaux de recherche ont mis en exergue les potentielles utilisations de l'essence aromatique de cet arbre à parfum comme biopesticide. **(Meyer, 2016).**

## *Partie expérimentale*

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. Afin de confirmer la résistance aux antibiotiques et de détecter la production des métallo-béta-lactamases. Dans un deuxième temps, une recherche des inhibiteurs naturels, à partir des extrait et l'huile essentielle de feuilles de *Eucalyptus globulus* et *Syzygium aromaticum*, des métallo-béta-lactamases a été effectuée par extraction spécifique des composés capable d'inhiber ces enzymes et une évaluation de l'activité de notre extrait sur l'enzyme responsable à la résistance a été étudiée.

## IV. Matériel

### IV.1. Matériel végétal

#### IV.1.1. Les plantes étudiées

Les travaux ont été effectués sur des échantillons de clou de girofle importé de l'Indonésie et disponible dans le marché tout long de l'année, pour son importance dans la tradition culinaire algérienne et pour *Eucalyptus globulus* au niveau de la commune de Ouled Brahim (wilaya de Saïda) juste à la période de la récolte (janvier 2022). La collecte des feuilles était effectuée le matin.

#### IV.1.2. Matériel d'extraction

- Montage soxhlet
- Montage hydrodistillation
- Spectrophotomètre
- Balance

### IV.2. Matériel biologique (microorganisme)

#### IV.2.1. Souches de références étudiées

<i>Escherichia coli</i>	ATCC25933	Gram-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC27853	Gram-

#### IV.2.2. Matériel pour la préparation des milieux

- Agitateur magnétique
- Balance de précision
- pH mètre
- Seringue
- Filtre millipore
- Micropipettes de 100 et 200 µl
- Embouts stériles
- Flacons en verre avec bouchon à vis de 5-100 et 200 ml
- Tubes stériles à bouchon de 2,5 et 5 ml
- Erlenmeyer
- Bain-marie
- Autoclave

#### IV.2.3. Matériel d'isolement

- Anse de platine

- Boîte de pétri
- Bec bunsen
- Etuve à 37°C
- Autoclave

#### **IV.2.4. Matériel pour l'identification**

##### **IV.2.4.1. Matériel de paillasse**

- Microplaques de 96 puits
- Micropipettes de 100 µl
- Embouts stériles de 200 et 1000 µl (max)
- Becher rempli d'eau de javel (hypochlorite de Na)
- Papier buvard
- Plateau (inoxydable de préférence)
- Etalon de Mac Farland d'échelle 2
- Anse de platine
- Emballage plastique
- Lame porte-objet

##### **IV.2.4.2. Matériel de laboratoire**

- Bec bunsen
- Etuve
- Four
- Agitateur magnétique
- Microscope optique

#### **IV.2.5. Matériel pour la conservation des souches**

- Tubes stériles à vis
- Tubes
- Portoirs
- Ecouvillons

#### **IV.2.6. Réactifs**

Réactifs pour l'enrichissement et l'isolement

- BTS : Bouillon Trypticase Soja
- Gélose Müller Hinton (MH)
- Gélose Trypticase Soja

- Gélose Mac Conkey
- BT : Bouillon au Thioglycolate

#### **IV.2.6.1. Réactifs pour l'identification**

- Glucides : glucose, mannitol, lactose, sorbitol, rhamnose, saccharose, inositol,
- adonitol, dulcitol
- Bleu de bromothymol, peptone tryptique, peptone bactériologique, rouge de phénol
- Chlorure de sodium
- Soude
- Bouillon nutritif
- L-tryptophane, L-arginine, L-phénylalanine, L-lysine, L-ornithine
- Phosphate monopotassique et dipotassique
- Citrate trisodique, malonate de sodium
- Urée
- Alcool 95°C
- Extrait de levure
- Sulfate d'ammonium
- Sulfate de magnésium
- Phosphate d'ammonium
- Thiosulfate de sodium
- Nitrate de potassium
- Bromocrésol pourpre
- Disque ONPG
- Gélatine
- Citrate de fer ammoniacal
- Esculine
- -Extrait de viande
- Acétate de Pb

### **IV.3. Méthodes**

#### **IV.3.1. Préparation de l'extrait**

Les feuilles d'*Eucalyptus globulus* sont récoltées et séchées à l'abri de la lumière et de l'humidité et à température ambiante. Une fois séchée, la matière végétale a été réduite en poudre. Le *Syzygium aromaticum* également a été réduite en poudre.



La préparation des extraits a été effectuée en utilisant plusieurs solvants selon le protocole suivant :

#### **IV.3.1.1. Délipidation**

Avant d'entamer l'extraction proprement dite, nous avons procédé à une dilapidation du matériel végétal par Soxhlet dans l'hexane. Cette méthode a été retenue comme technique d'extraction car elle favorise une extraction relativement complète des métabolites présents dans la matrice végétale, cette étape préliminaire a pour but d'éliminer les lipides et les pigments (**Bouchouka, 2016**).

- **Préparation d'extrait dans hexane**

L'extraction a été effectuée par un système Soxhlet (figure24). 50 g de deux plantes étudiées sont disposés dans une cartouche cellulosique poreuse, puis introduite dans l'extracteur du Soxhlet. 250 ml de l'hexane est mis en ébullition à température de 68°C dans un ballon monocole relié au pied de l'extracteur. Les vapeurs dégagées passent par une tubulure menant au réfrigérant pour y être condensées. Le condensat tombe par gravité dans le réservoir contenant la cartouche et solubilise les molécules actives. Une fois plein, le mélange solvant-extrait est siphonné vers le ballon ce qui permet de régénérer le solvant et de recommencer un autre cycle (**Haddoudi, 2014**).

#### **IV.3.1.2. L'extraction**

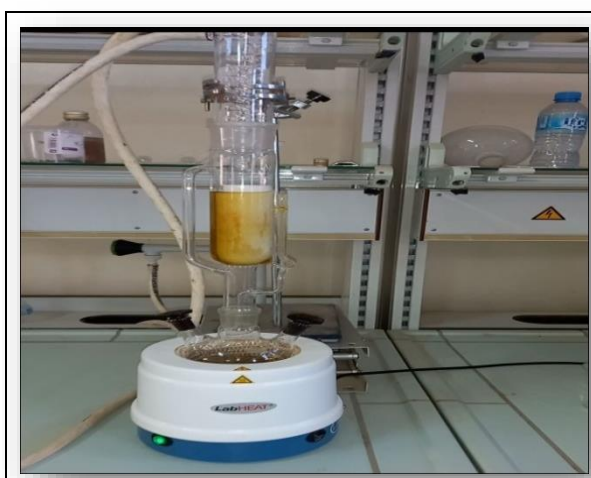
Veut dire la séparation des parties actives de tissus végétaux des composants actifs ou inertes et les retirer à l'aide de l'eau ou des solvants sélectifs ont des polarités différentes. Les produits obtenus sont relativement sous forme de liquides, semi-solides ou poudres exclusivement destinées à un usage oral ou externe. Il s'agit de préparations connues comme les tisanes et les huiles médicinales. Dans notre étude, l'extraction est effectuée par l'utilisation d'un solvant organique polaire, l'éthanol, par Soxhlet, afin d'avoir des principes actifs de notre plante. Cependant, l'extraction des huiles essentielles a été réalisée par l'entraînement à la vapeur. Une délipidation a été effectuée préalablement pour éliminer les lipides et qu'est considérée comme extraction par un solvant apolaire, l'hexane (**Handa, 2008**).

- **Préparation d'extrait dans éthanol**

L'extraction a été effectuée par Soxhlet (figure 24) en utilisant l'éthanol. La matière végétale obtenue par la première extraction hexanique est disposée dans une cartouche

cellulosique poreuse, puis introduite dans l'extracteur du soxhlet. 250 ml de l'éthanol est mis en ébullition à température de 68°C dans un ballon monocole relié au pied de l'extracteur. Les vapeurs dégagées passent par une tubulure menant au réfrigérant pour y être condensées. Le condensat tombe par gravité dans le réservoir contenant la cartouche et solubilise les molécules actives. Une fois plein, le mélange solvant-extrait est siphonné vers le ballon ce qui permet de régénérer le solvant et de recommencer un autre cycle (figure 23).

La durée d'extraction est variée entre 20 à 30 minutes, celui-ci est mesuré à partir du moment de l'ébullition du solvant. Après le quatrième cycle le mélange solvant-extrait est filtré évaporer du solvant par rotavapeur (figure 24) et conservé au 4°C, tandis que la matière végétale est re-extrait par extrait éthanolique



**Figure 23:** L'extraction par un système Soxhlet



**Figure 24:** Evaporation sousvide par rotavapor de type Heidolph

#### IV.4. Préparation d'huile essentielle

- **Hydrodistillation par entraînement à la vapeur**

L'extraction par entraînement à la vapeur d'eau consiste à soumettre le matériel végétal à l'action d'un courant de vapeur ascendant car l'injection de la vapeur se fait à la base de l'extracteur (alambic). Les vapeurs contenant les composés volatils sont condensées, puis les liquides (distillat + huile essentielle) sont décantés dans un vase florentin (**Rabehaja, 2013**).

La plante a été distillée par entraînement à la vapeur d'eau. Nous avons utilisé montage d'entraînement à la vapeur (figure 25). Une quantité de 1000g (1kg) de la matière sèche située au-dessus d'une grille et subit un passage de la vapeur d'eau 2 litres bouillante à travers le matériel pendant une durée de deux (02) heures. Les huiles essentielles obtenues sont conservées dans un tube en verre à 4°C à l'abri de la lumière (emballé avec l'aluminium) (**Sutour, 2010**).



**Figure 25:** Hydrodistillation par entraînement à la vapeur

#### IV.5. Calcul de rendement

##### IV.5.1. Pour les extraits

Le pourcentage en extrait (éthanolique ou hexanique) de la plante est calculé par la formule suivante (**Labiod, 2016**):

$$\text{Rdt}\% = (P/P_0) \times 100$$

Rdt%: Rendement exprimé en %.

P: Poids en gramme de l'extrait sec résultant.

P<sub>0</sub>: Masse en gramme du matériel végétal à traiter.

#### IV.5.2. Pour l'huile essentielle

Le rendement en huile essentielle (R) est le rapport entre le poids de l'huile extraite (P') et le poids de la plante traitée (P).

Il est exprimé en pourcentage et calculé par la formule suivante (**Labioud, 2016**)

$$\text{Rdt}\% = (P'/P) \times 100$$

R% : Rendement de l'huile en (%).

P' : Poids de l'huile en (g).

P : Poids de la plante en (g).

#### IV.6. Tests phytochimiques (Screening phytochimique)

Les tests phytochimiques (Screening) sont des tests qualitatifs qui permettent de caractériser les différents groupes chimiques contenus dans un organe végétal. Ce sont des réactions physicochimiques qui permettent d'identifier la présence des substances chimiques. Nous allons caractériser la présence des métabolites secondaires (saponosides, alcaloïdes, flavonoïdes, tanins, coumarines, composés réducteurs et autres)

##### IV.6.1. Les substances polyphénoliques

###### a. Tanins

Dans un tube à essai, introduire 5 ml d'extrait à analyser, ajouter 1ml d'eau et 1 à 2 gouttes de solution aqueuse de FeCl<sub>3</sub> diluée à 1%. En présence de tanins, il se développe une coloration verdâtre ou bleu-noirâtre.

- L'apparition d'une coloration vert foncé ou bleu-verte indique la présence des tanins.
- L'apparition d'une coloration vert foncé indique la présence des tanins catéchiques.
- L'apparition de la coloration bleu-verte indique la présence des tanins galliques.

###### b. Flavonoïde

A 5 ml d'extrait à tester, ajouter, 1 ml d'alcoolisoamylique, quelques copeaux de magnésium et quelques gouttes d'acide chlorhydrique (HCl), l'apparition d'une coloration rose ou rouge indique la présence des flavonoïdes.

###### Teste phytochimique

##### IV.7. Détermination de la teneur en polyphénols totaux (PPT)

Les composés phénoliques totaux ont été dosés à l'aide du réactif de Folin-Ciocalteu, après la méthode de Singleton et Rosi (1965), légèrement modifiée par Dewanto, Wu, Adom

et Liu (2002). Une aliquote de la fraction d'échantillon (extrait sec solubilisé dans le DMSO) diluée a été ajoutée à 0,5 ml d'eau distillée et 0,125 ml de réactif de Folin-Ciocalteu. Le mélange a été secoué et incubé pendant 6 min avant d'ajouter 1,25 mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (7%). La solution a ensuite été ajustée avec de l'eau distillée à un volume final de 3 mL et bien mélangé. Après incubation dans l'obscurité, l'absorbance a été lue à 760 nm par rapport à un blanc préparé. Total les teneurs en composés phénoliques ont été exprimées en milligrammes d'équivalents d'acide gallique par gramme de résidu sec (mg GAE g<sup>-1</sup> DR) à travers la courbe d'étalonnage avec de l'acide gallique. La plage de la courbe d'étalonnage était de 0 à 400 mg/mL. Tous les échantillons ont été analysés en trois répétitions.

- **Les résultats**

Sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique /g de matière végétale sèche et les teneurs en polyphénols totaux sont calculées selon la formule suivante:

$$PPT = a \times f/b$$

a : Concentration en polyphénols en mg/mL déterminée à partir de la courbe d'étalonnage.

f : Facteur de dilution (x22).

b : Concentration initiale de l'extrait (1mg/mL).

#### **IV.8. Détermination de la teneur en flavonoïdes totaux (FVT)**

Les flavonoïdes totaux ont été mesurés à l'aide d'un test colorimétrique développé par Dewanto et al. (2002). Une aliquote d'échantillon dilué ou de solution standard de (1)-catéchine a été ajoutée à 75 ml de solution de NaNO<sub>2</sub> (7 %) et mélangé pendant 6 min avant d'ajouter 150 mL AlCl<sub>3</sub> (10%). Après 5 min, 500 ml de NaOH solution (1 M) a été ajoutée. Le volume final a été ajusté à 2,5 ml, soigneusement mélangé et l'absorbance du mélange a été déterminée à 510nm. Les flavonoïdes totaux ont été exprimés en mg (1) d'équivalent catéchine par gramme de résidu sec (mg CE/g DR), par la courbe d'étalonnage de (1)-catéchine (gamme de 0 à 400 mg/mL). Les échantillons ont été analysés en trois exemplaires.

La lecture est faite à 510 nm contre un blanc. Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la catéchine comme contrôle positif à différentes concentrations finales de 0,1 ; 0,2 ; 0,3 ; 0,4 ; 0,5 ; 0,6 ; 0,7 et 0,8 mg/mL.

- **Les résultats**

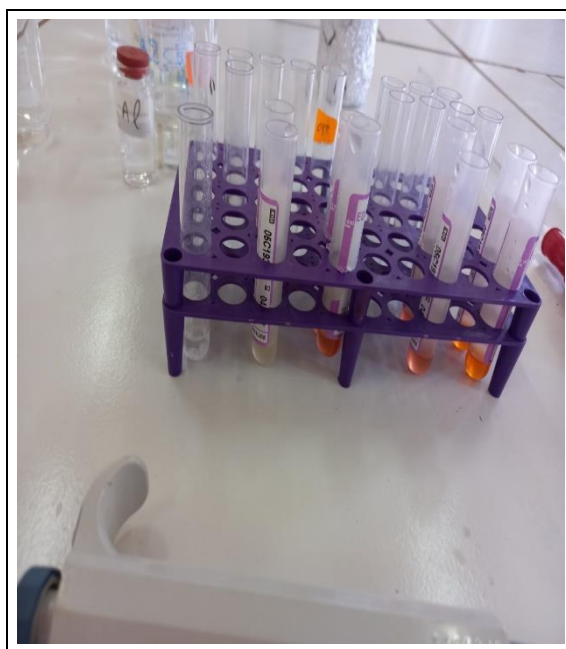
L'apparition d'une coloration rose ou rouge indique la présence des flavonoïdes les résultats sont exprimés en mg équivalent de catéchine par gramme de matière végétale sèche, selon la formule suivante:

$$\text{FVT} = a \times f / b$$

a: Concentration des flavonoïdes en mg/mL déterminée à partir de la courbe d'étalonnage.

f: Facteur de dilution (x10).

b: Concentration initiale de l'extrait (10 mg/mL).



**Figure 26:** Test des flavonoïdes positive par coloration rose ou rouge

## IV.9. Identification bactérienne

**IV.9.1. Identification macroscopique:** par le milieu de culture sélectif

### IV.9.2. Gélose Hektoen

La gélose Hektoen est un milieu différentiel modérément sélectif servant à l'isolement et à la culture de microorganismes entériques à Gram négatif. La présence de sels biliaires et de colorants inhibe la plupart des organismes à Gram positif, ce qui permet uniquement aux bacilles à Gram négatif de se développer sur la gélose. En particulier à l'isolement des espèces *Shigella* et *Salmonella* issues d'échantillons fécaux (flore mixte) (Kings et al., 1999).



**Figure 27:** Culture bactérienne de *Escherchia coli* cultivé dans le milieu gélose hektoen

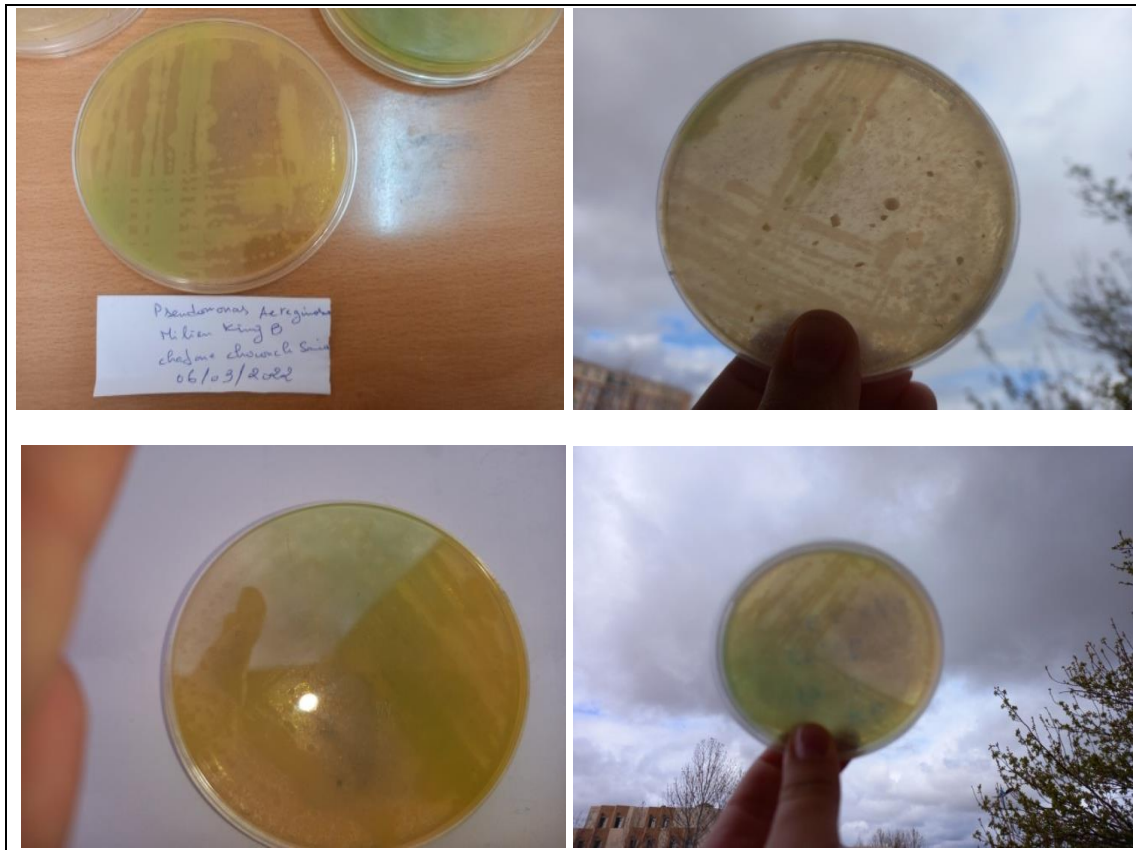
### IV.9. 3. Gélose King A et King B

Des espèces bactériennes Gram (-), des *Pseudomonas* produisent des pigments dont les deux principaux (pyocyanine et pyoverdine) peuvent être mis en évidence sur les géloses King A et King B. (S. Kings et al ,1999)

Le milieu est ensemencé par strie sur la pente, incubation à 37°C pendant 24h.

King A: ce milieu favorise la production de pyocyanine, pigment permettant l'identification de *Pseudomonas aeruginosa*. Les cultures typiques sont colorées en bleu-vert. (Kings et al., 1999).

King B: ce milieu favorise la synthèse de la pyoverdine, pigment vert fluorescent produit par les Gram (-) *Pseudomonas aeruginosa* et d'autres *Pseudomonas* (*Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*). La pyoverdine se manifeste par une coloration vert fluorescent du milieu de culture. (Kings et al., 1999).



**Figure 28:** La production de pigment par la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* (à droit) et *Escherchia coli* (à gauche ) dans milieu Gélose King A.

#### IV.9.4. Examen microscopique

Certains colorations permettent d'observer plus facilement la morphologie des bactéries (capsule flagelle, pilis,...etc) alors que le cas de Gram reste la base différentielle de la bactériologie, avec lequel on distingue les deux grandes groupes à gram négatif.

##### IV.9.4.1. 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 de suspension bactérienne, préparée avec de l'eau physiologique et placée entre lame et lamelle. L'observation se fait sur microscope photonique au grossissement x40 ou x60 (**Fagbemi ,2010**).

##### IV.9.4.2. Coloration de Gram

C'est une coloration qui nous permet de connaître la forme, l'arrangement, la pureté ainsi que la nature biochimique de la paroi des cellules purifiées (**Fagbemi ,2010**)

- **Mode opératoire**

La coloration de Gram se déroule en plusieurs étapes qui se succèdent et consistent à:

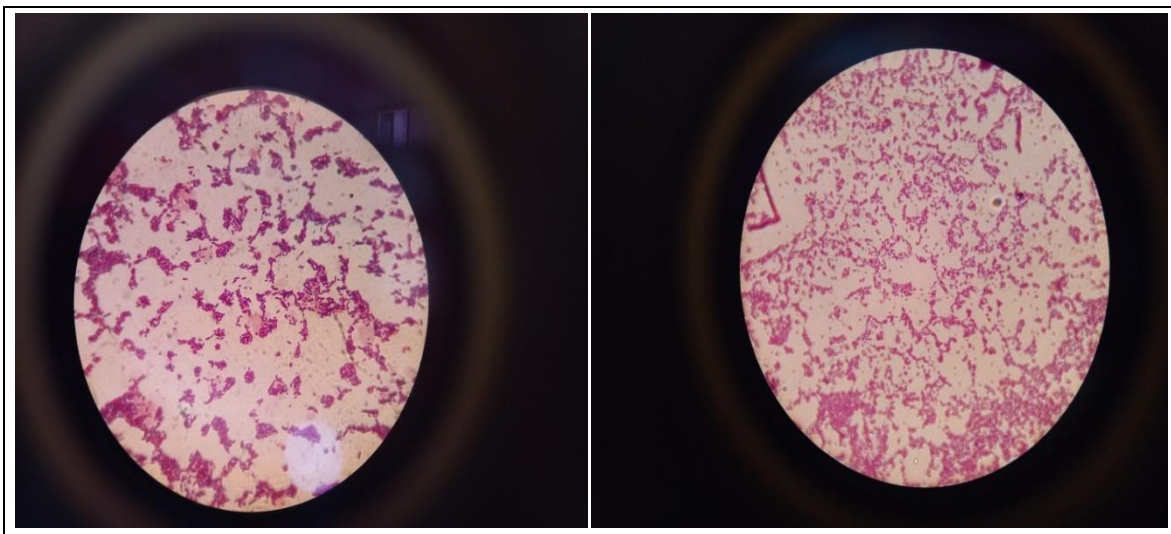
- fixer le frottis



- recouvrir le frottis de la solution de violet de gentiane, laissé agir une minute
- rejeter le colorant puis laver à l'eau
- recouvrir la préparation de lugol, laisser agir une minute
- rejeter le lugol puis laver à l'eau
- décolorer à l'alcool 95°
- rincer à l'eau courante et recouvrir la lame de solution de fuchsine diluée, laisser agir quelques secondes (Fagbemi ,2010).



**Figure 29:** Préparation de préculture des souches culture jeune (24h)

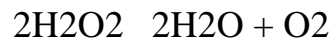


**Figure 30:** Observation microscopique par coloration de Gram des souches étudiées *Escherchia coli* (à droite) *Pseudomonas aeruginosa* (à gauche) ×100.

## IV.10. Tests biochimiques

### IV.10.1. Recherche de la catalase

La catalase a la propriété de décomposer l'eau oxygénée avec dégagement d'oxygène. C'est l'action directe de l'enzyme qui est mise en évidence dans la masse bactérienne. (Karnwal, 2009).

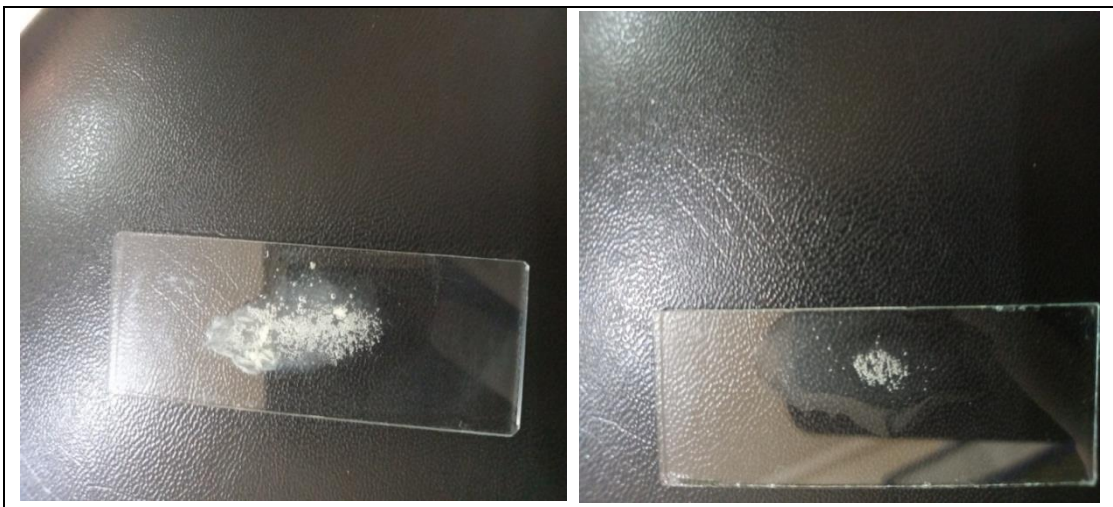


On prend une goutte d'eau oxygénée ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) à 10 volumes qu'on dépose sur une lame avec une colonie bien distincte de culture jeune de 24 h, le dégagement immédiat de bulles d'oxygène exprime la présence d'une catalase. (Karnwal, 2009)

**Résultats:** La présence de catalase se matérialise par une production de bulles. Les *Pseudomonas* sont catalase positive (+) *Escherchiacoli* sont catalase positive (+). (Karnwal, 2009)



**Figure 31:** préparation de test catalase sur la lame



**Figure 32:** Dégagement immédiat de bulles d'oxygène exprime le test catalase (+) pour *Pseudomonas aeruginosa* (à droite) et *Escherchia coli* (à gauche).

## **IV.11. Recherche des souches sécrétrices des métallo-bêta-lactamases**

### **IV.11.1. Test à l'EDTA**

La recherche des métallo-bêta-lactamases (MBLs) a été effectuée sur les souches résistantes à l'IPM en mettant à profit la faculté de l'éthylène-diamin-tetra-acetic-acid (EDTA), chélateur bivalent à restaurer l'activité de l'IPM en chélatant les ions  $Zn^{2+}$  indispensables à l'activité de la MBL et la rendant ainsi inactive. Deux techniques phénotypiques ont été réalisées afin de rechercher la présence probable de MBLs:

**Le test IMP-EDTA (the combination disk test) (CDT) (GUPTA ET AL., 2006) et le test de synergie avec doubles disques (DDST)**

### **IV.11.2. Technique test à l'EDTA**

A partir des cultures jeunes sur la Gélose Mueller-Hinton (MH) nous avons prélevé cinq (05) colonies bien isolées et identiques dans 50 ml culture liquide (bouillon nutritif)

stérile, agitées manuellement pendant quelques secondes. L'ajustement de la charge bactérienne à 10<sup>8</sup> UFC/ml, est réalisé à l'aide d'un spectrophotomètre réglé sur une longueur d'onde de 625 nm.

Selon la standardisation de Mc Farland, nous admettons une DO comprise entre 0.08 et 0.1 correspond à une concentration de 10<sup>8</sup> UFC/ml Par la suite, des surfaces entières de la gélose Mueller Hinton préalablement coulé dans des boites de pétri ont étéensemencées par cette suspension microbienne par la technique d'écouvillonnage.

Dans la même boite de géloseensemencée, on dépose deux disques contenant chacun 10 µl d'imipenème à deux centimètres d'intervalle auxquels on rajoute à l'un d'eux 10 µl d'EDTA (Gupta et al., 2006).

#### **IV.11.3. Préparation des suspensions bactériennes :**

Les tests antimicrobiens sont effectués à partir de colonies jeunes (bactéries 18 à 24 h) en phase de croissance exponentielle. L'obtention de l'inoculum pour les bactéries s'effectue comme suit : à partir de la préculture bactérienne en milieu solide GN de 24 h à 37°C, nous avons prélevé quelques colonies (5 colonies de même taille, aspect et de diamètre) que nous avons resuspendues dans le BN. L'inoculum est ajusté à 10<sup>8</sup> cellules/ml (une DO de 0,08 à 0,1) par lecture de la DO à une longueur d'onde de 625 nm (Halla, 2010).

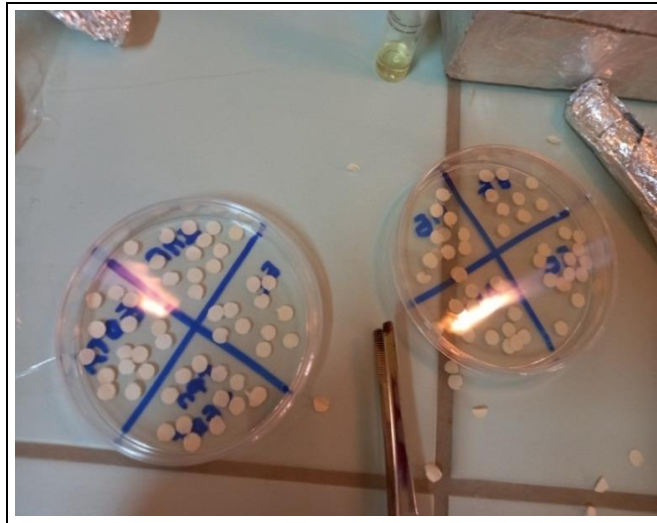
#### **IV.11.4. Ensemencement**

Ensemencement des boites : Les boites de Pétri contenant de Mueller Hinton gélosé (MH) sontensemencées aseptiquement par écouvillonnage, Ensuite elles sont séchées à proximité de la flamme (15 min). L'ensemencement est fait par la méthode d'écouvillonnage ; on trempe l'écouvillon dans la suspension bactérienne, on frotte l'écouvillon sur la totalité de la surface, de haut en bas, en stries serrées. On répète l'opération deux fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose. On dépose les disques d'antibiotiques à tester. On incube les boites pendant 24H à 35°C. (Halla, 2010). Des souches de contrôle de qualité; *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

#### **IV.11.5. Préparation des disques**

La préparation des disques se fait à partir du papier Wattman qui est découpé en disques de 06 mm de diamètre. Les disques sont chargés de principe actif à testés 10 µl à

différents extraits de plantes clou de girofle et eucalyptusglobulus (extrait méthanolique et l'HE) et d'antibiotique (IMP).



**Figure 33:** Remplissage des disques par les extraits dans la zone stérile

**Application:** Les disques sont déposés à l'aide d'une pince stérile à la surface du milieu gélosé, préalablement ensemencé. Ils doivent être parfaitement appliqués à plat sans glissement en appuyant légèrement sur la surface de la gélose. Les boîtes de Pétri sont ensuite fermées et laissées diffuser à température ambiante pendant 30 minutes avant d'être incubées. Les boîtes sont incubées pendant 18 à 24 heures à 37 °C pour les bactéries. Le diamètre de la zone d'inhibition au tour des disques est alors mesuré (**Labiod, 2016**).

#### **IV.11.6. Expression des résultats**

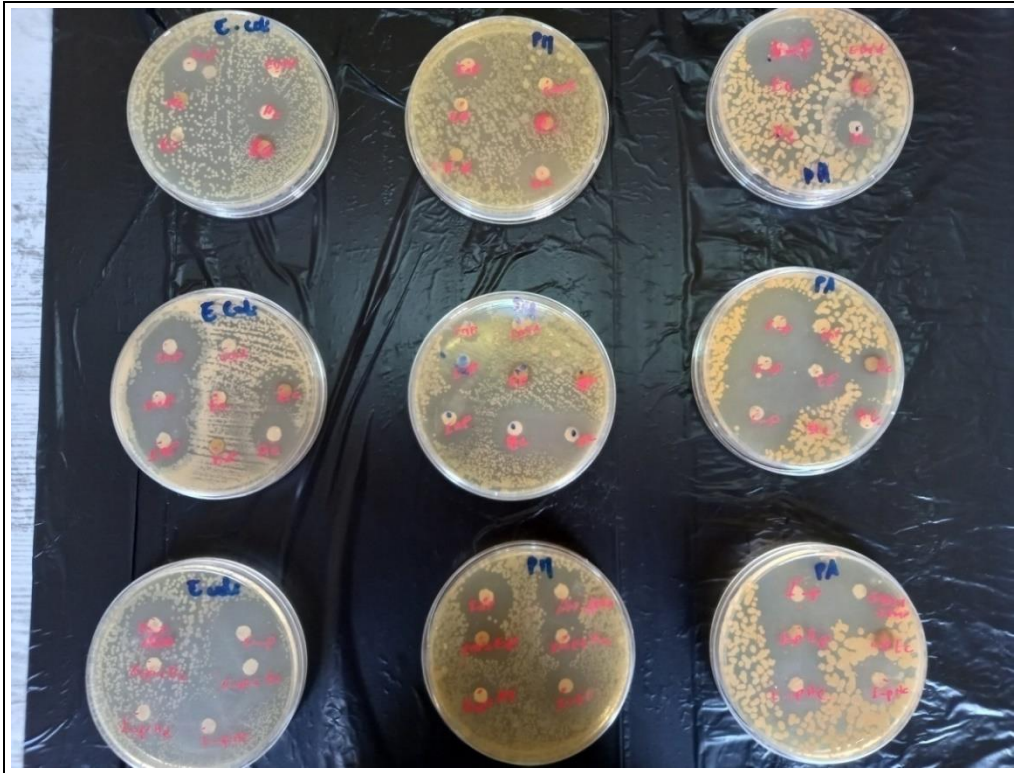
**Lecture :** l'activité antimicrobienne est exprimée en zones d'inhibition Après 16 à 18 h d'incubation à 37 °C, les diamètres des zones d'inhibition sont notés en millimètre (mm). (**Barros et al., 2007**)

Diamètres inférieurs à 7 mm : aucune activité antimicrobienne (-)

Diamètres de 7 à 9,9 mm : activité antimicrobienne faible (+)

Diamètres de 10 à 11,9 mm : activité antimicrobienne modeste (+ +)

Diamètres de 12 à 15 mm : activité antimicrobienne élevée (+ + +) (**Barros et al., 2007**)



**Figure 34:** Activité antibactérienne (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* et *pseudomonas aeruginosa*) d'extrait éthanolique et huile essentielle de *Syzygium aromaticum* et *Eucalyptus globulus*, et antibiotique Imipénem



**Figure 35:** Activité antibactérienne (*Escherichia coli*) d'extrait éthanolique et l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* et antibiotique Imipénem



**Figure 36:** Activité antibactérienne (*Pseudomonas aeruginosa*) d'extrait éthanolique et huile essentielle de *Syzygium aromaticum* et antibiotique Imipénem

#### **IV.11.7. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (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). Cette méthode est réservée uniquement pour les bactéries aérobies non exigeantes.

Le Bouillon Mueller Hinton (MH) (pH de 7,2 à 7,4) est largement utilisé comme milieu standard pour la micro-dilution en plaque. Ce bouillon est considéré comme milieu de référence. A partir d'une préculture 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. Elles sont ensuite placées dans une étuve à 37°C jusqu'à l'obtention d'une concentration cellulaire de 10<sup>8</sup> cellules/ ml (une DO de 0.08 à 0.1,  $\lambda = 625\text{nm}$ ). Une dilution au 1/100<sup>ème</sup> est effectuée pour avoir un inoculum final de 10<sup>6</sup> cellules/ ml. Pour chaque ligne de la microplaque, nous avons déposés 50 $\mu\text{l}$  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 milieu de culture comme témoin positif (100  $\mu\text{l}$ ). Bouillon MuellerHinton (MHB). Nous avons ensuite ajouté 50  $\mu\text{l}$  de la solution de l'huile essentielle 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 HE). Les plaques sont scellées et placées dans une étuve à 37°C pendant 24 heures. Matériel et méthodes 36 La plus faible concentration de chaque

fraction ne montrant aucune croissance sera considérée comme la concentration minimale inhibitrice (CMI) (Prescott et al., 1995).

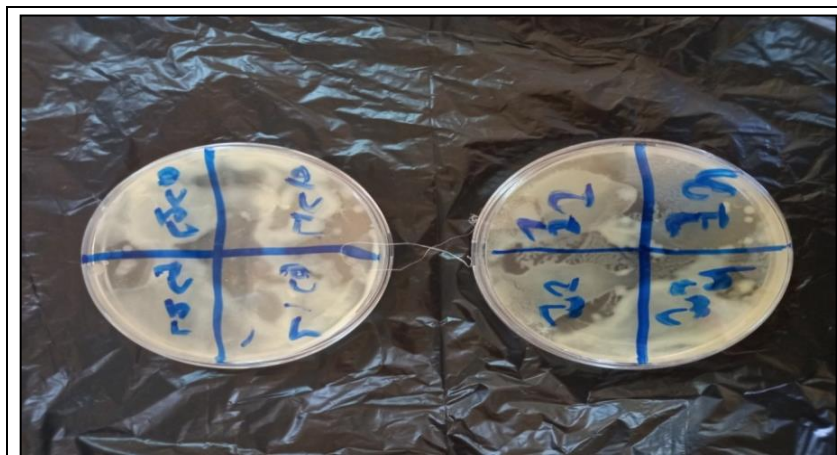


**Figure 37:** Remplissage de microplaque pour la détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI de la souche *Escherchia coli* par les dilution des extraits éthanoliques et huile essentielle de *Syzyguim aromaticum* et antibiotique Imipénem

#### **IV.11.8.3. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)**

La CMB est définie comme la plus faible concentration de l'antibactérien qui détruit 99,9% de la concentration cellulaire finale. Après la détermination de la CMI (durant 24h d'incubation à 37°C), les deux puits contenant les concentrations en huile essentielle strictement supérieures à la CMI vont servir pour la détermination de la CMB. Pour ce faire, un échantillon de 10 µl de chaque puits (ne présentant pas de croissance) va être transféré dans des boîtes de Pétri contenant du milieu Gélose nutritive. Les boîtes sont incubées dans une étuve à 37°C pendant 24 h. Cette technique nous permet de vérifier si les cellules sont viables et cultivables. La boîte de celle de la CMB renferme un nombre de colonies inférieur à 3 (Prescott et al., 1995).





**Figure 38:** Développement de la culture bactérienne *Escherichia coli* sur boîtes de Pétri contenant du milieu Gélose nutritive incubé pour la Détermination de la concentration minimale bactéricide de l'huile essentielle de extrait éthanolique de *Syzygium aromaticum* et Antibiotique imipénem

#### IV.12. Extrait semi-purifié de bêta-lactamases

Extraction semi purifiés de bêta-lactamases ont été préparés, à partir de la souche *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* qui se sont avérées selon les résultats du test CDT, productrices de métallobêta-lactamases. En pratique, 55.5 g de BHI sont rajoutés progressivement à un volume suffisant d'eau chaude pour 1.5 l. le bouillon obtenu est répartie sur six erlenmeyer de 1l de volume à raison de 250 ml par erlenmeyer. Après stérilisation (autoclave), 250 ml de bouillon sont inoculés au préalable par la souche de *P.aeruginosa* puis incubées à 37°C pendant 18 h sous agitation. L'inoculum obtenu est utilisé pour ensemençer les cinq erlenmeyers à raison de 50 ml d'inoculum par erlenmeyer. Après addition de 0.5mg/ml d'imipénème à chaque erlenmeyer (pour induire la sécrétion des enzymes) et incubation de ces dernières dans les mêmes conditions (Gupta et al., 2006).



**Figure 39:** Incubation de l'inoculum dans un Bains-marie à agitation à 37°C pendant 18 h

Le milieu de culture est centrifugé à 3000 tr/min pendant 15 min. le surnageant est rejeté et les culots cellulaires sont nettoyer deux fois par Tampon phosphate PBS (phosphate buffered saline), puis introduit dans un 80 ml solution tampon (0.2 M tris-0.1 M Hcl-

sacharose à 20 %). Le fractionnement cellulaire a été réalisé par double choc l'un osmotique et l'autre thermique au même temps. Concernant choc osmotique en utilisant une solution tampon (0.2 M tris + 0.1 M Hcl + sacharose à 20 %). Maintenant il est le rôle de choc thermique par incubation pendant 10 min et refroidissement rapide dans l'eau congelée pendant 10 min. Cette dernière étape est réalisée 3 fois successivement. Les homogénats obtenus sont centrifugés à 10000 g pendant 40 min à 4 °C. Les surnageant obtenus sont pool. Le pool (surnagent) est agité pendant 30 min par l'ajout 50.6 g de sulfate d'ammonium et lisser 1 heure pour l'homogénéisation. Le mélange est centrifugé à 17 000 g pendant 30 min à 4 °C Les culots récupérés dans 50 ml du tampon (0.2 M tris +0.1 M Hcl) et ensuite dialysé contre le tampon (0.2 M tris +0.1 M Hcl) pendant 24 h et cette dernière étape est réalisée 3 fois. Le dialysat, constitue notre extrait semi-purifié de bêta-lactamases et est répartie dans des tubes eppendorf à raison de 200 µl par tube puis conservé à (-20°C) jusqu'à utilisation. (Gupta et al., 2006).



**Figure 40:** Nettoyage de culots cellulaires (après centrifugation à 3000 tr/min pendant 15 min) deux fois par Tampon phosphate PBS (phosphate buffered saline)



**Figure 41:** Ultracentrifugation de milieu par appareil ultracentrifuge réfrigérée à 4 °C



**Figure 42:** Les culots récupérés dans 50 ml du tampon (0.2 M tris +0.1 M Hcl)

## *Résultats et discussion*

Le but de cette étude était de rechercher des nouveaux inhibiteurs de l'activité enzymatique des Mérallo-Béla-Lactamases (MBL) à partir de l'extrait éthanolique et l'huile essentielle de la plante *Eucalyptus globulus et Syzygium aromaticum*. Nous nous sommes intéressés à isoler et identifier des souches productrices des MBL à partir des souches de référence *Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 et Escherichia coli ATCC 25922*. 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 d'*Eucalyptus globulus et Syzygium aromaticum* par une extraction par des solvants de différentes polarités et extraction des huiles essentielles de ces plante. L'analyse quantitative a été effectuée pour déterminer le taux des polyphénols et 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. Les Deux souches ont révélé un résultat positif par CDT qui signifie leur propriété productrice des MBL. Une seule souche et une seule plante a été choisie pour l'étude de la cinétique enzymatique. Le résultat d'identification a montré que la souche sélectionnée était *Escherichia coli ATCC 25922* et la plante était *Syzygium aromaticum*. Le rendement de l'extrait et huile essentielle préparé à partir des feuilles d'*Eucalyptus* a fin de déduire Le résultat de la cinétique enzymatique qui indique le type d'inhibition enzymatique les Mérallo-Béla-Lactamases semipurifiées à partir de la souche *Escherichia coli ATCC 25922*.

## V. Détermination et calcul des rendements

### V.1. Pour les extraits

Le pourcentage en extrait (éthanolique ou hexanique) de la plante est calculé par la formule suivante (**Labioud, 2016**):

$$\text{Rdt}\% = (P/P_0) \times 100$$

Rdt% : Rendement exprimé en %.

P : Poids en gramme de l'extrait sec résultant.

P<sub>0</sub> : Masse en gramme du matériel végétal à traiter.

### V.2. Pour l'huile essentielle

Le rendement en huile essentielle (R) est le rapport entre le poids de l'huile extraite (P') et le poids de la plante traitée (P).

Il est exprimé en pourcentage et calculé par la formule suivante (**Labioud, 2016**):

$$\text{Rdt}\% = (P'/P) \times 100$$

R% : Rendement de l'huile en (%).

P' : Poids de l'huile en (g).

P : Poids de la plante en (g).

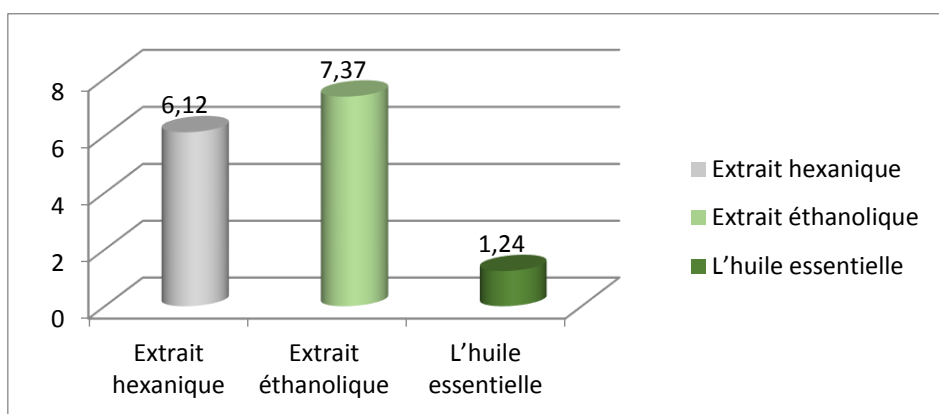
La préparation des extraits à partir de la partie aérienne des deux plantes a été effectuée par des différentes méthodes d'extraction et des solvants à différentes polarités (hexane et éthanol). Cette extraction a permis d'obtenir deux extraits bruts: extrait hexanique, l'extrait éthanolique. Le rendement des extraits est exprimé en pourcentage de masse d'extrait par rapport à la masse de la plante séchée, le rendement le plus élevé a été observé en extrait éthanolique (7,37%), et l'extrait hexanique (6,12%) pour *Eucalyptus globulus* et de 8.65% pour l'extrait éthanolique et 7% pour celui hexanique de *Syzygium aromaticum*. Cependant, les huiles essentielles ont marqué le rendement le plus faible par un pourcentage de 1,60% de *Syzygium aromaticum* et 1.24% de *Eucalyptus globulus*. Les résultats obtenus sont représentés dans le Tableau 5 et 6.

**Tableau 5:** Représente les différents rendements des extraits et huile essentielle de *Eucalyptus globulus*

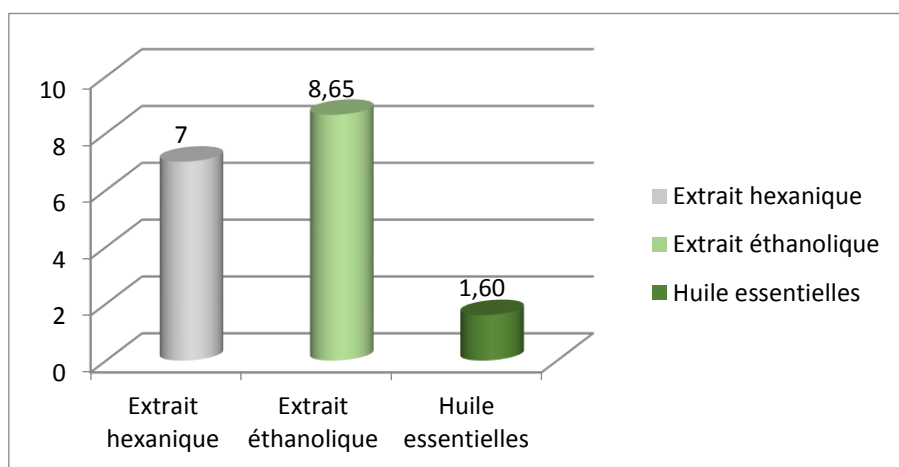
<b>Extrait hexanique</b>	<b>6,12%</b>
<b>Extrait éthanolique</b>	<b>7,37%</b>
<b>L'huile essentielle</b>	<b>1,24%</b>

**Tableau 6:** Représente les différents rendements des extraits et huile essentielle de *Syzygium aromaticum*

<b>Extrait hexanique</b>	<b>7%</b>
<b>Extrait éthanolique</b>	<b>8,65%</b>
<b>Huile essentielles</b>	<b>1,60%</b>



**Figure 43:** Histogramme représentant les différents rendements des différents extraits de *Eucalyptus globulus*



**Figure 44:** Histogramme représentant les différents rendements des différents extraits de *Syzygium aromaticum*

Il est important de souligner que la méthode utilisée (le choix des solvants), ainsi que les conditions dans lesquelles l'extraction est effectuée (à chaud ou à froid), affectent tous

le contenu total en phénols et flavonoïdes, et par conséquent affecte les activités biologiques médiées par ces métabolites (Lee et al., 2003).



Dans une étude réalisée par Kamouche (2021) qui ont déclaré que *Syzygium aromaticum* a donné après extraction un rendement de 14,5% et d'huile et 1.7% pour *Syzygium aromaticum*. Une autre étude réalisée par Boukhaloun (2012) qui ont déclaré que l'*Eucalyptus globulus* a donné après extraction un rendement de 13.96% et d'huile essentielle rendements de 2.4%

La grande variabilité observée des rendements en extrait et huile essentielle selon l'âge de la plante de l'espèce montre clairement l'influence des facteurs biologiques et physiologiques (cycle végétatif), si on se réfère à quelques données de la littérature. A la différence de protocole qui se déroule à température ambiante, l'extraction au Soxhlet se fait à la température d'ébullition du solvant, ce qui entraînerait la dégradation thermique des composés thermosensibles (Popovici et al., 2011).

Il est difficile de comparer les résultats du rendement avec ceux de la bibliographie, car le rendement n'est que relatif et dépend de la méthode et les conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée, ainsi qu'à l'origine géographique de l'épice.

L'aspect physique des extraits d'eucalyptus globulus L'aspect physique ainsi que les couleurs obtenus lors de l'extraction sont représenté dans le tableau 7.



**Tableau 7:** L'aspect physique et la couleur des extraits et huile essentielle de l'*Eucalyptus globulus*

Extrait	Aspect	Couleur	
Hexanique	Pâteux, collant	Vert foncé	
Éthanolique	Pâteux, collant	Vert brunâtre foncé	
Huile essentielle	Huileuse	Beige jaunâtre	



Aspect physique des extraits d'*Eucalyptus globulus* ainsi que les couleurs obtenus lors de l'extraction sont représentées dans le tableau 8.

**Tableau 8:** L'aspect physique et la couleur des extraits et huile essentielle d'*Syzygium aromaticum*

Extrait	Aspect	Couleur	
Hexanique	Pâteux, collant	Vert foncé	
Ethanolique	Pâteux, collant	Vert foncé	
Huile essentielle	Huileuse	Jaune	

L'huile essentielle de la partie aérienne d'*Eucalyptus globulus* et *Syzygium aromaticum* obtenue par la méthode d'entraînement à la vapeur est un liquide visqueux, d'une couleur jaune d'*Eucalyptus globulus*, et de couleur Beige jaunâtre avec une forte odeur caractéristique de *Syzygium aromaticum*



La préparation des extraits à a été effectuée par des solvants à polarité croissante il s'agit d'Hexane et éthanol. Les extraits éthanolique et hexanique ont un aspect pâteux collant pour l'*Eucalyptus globulus* et *Syzygium aromaticum* avec une couleur vert foncé et vert brunâtre

### V.3. Screening phytochimique

Les tests phytochimiques consistent à identifier les différentes familles des métabolites secondaires, en réalisant une analyse qualitative des extraits de la plante par des essais de solubilités des constituants, des réactions de précipitation et de turbidité, par un changement de couleur spécifique ou un examen sous la lumière ultraviolette, avec des solvants de polarité différente et des réactifs spécifiques de révélation (El mouloud, 2016).

Les analyses phytochimiques qualitatives réalisées sur les deux extraits obtenus à partir des feuilles de *Eucalyptus globulus* ont montré les résultats regroupés dans le tableau 9 et *Syzygium aromaticum* sont regroupés dans Tableau 10.

**Tableau 9:** Résultats du screening phytochimique d'*Eucalyptus globulus*



Groupe chimique	Extrait éthanolique	
Polyphénols	+	
Flavonoïdes	++	

(+) : Présence faible (+++) : Présence forte

(++) : Présence moyenne ; (-) : Absence

**Tableau 10:** Résultats du screening phytochimique d'*Syzygium aromaticum*

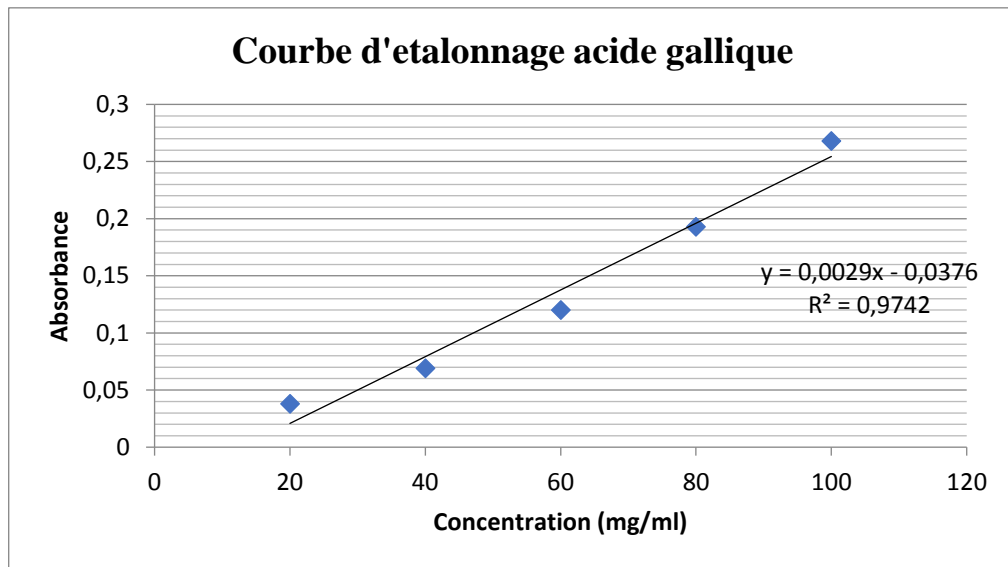
+ : présence du composé; - : absence

Groupe chimique	Extrait éthanolique	
Polyphénols	++	
Flavonoïdes	+++	

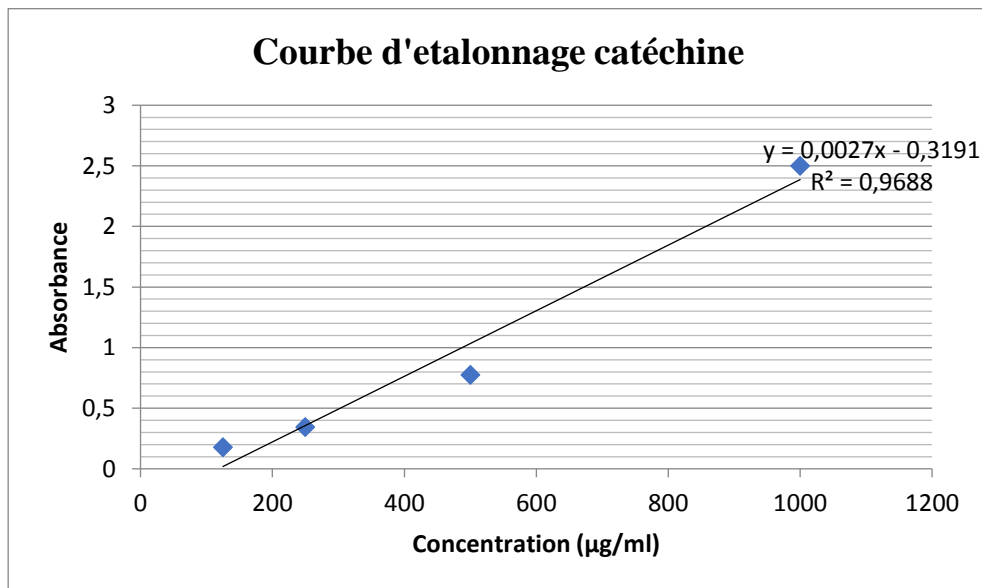
(+) : Présence faible (+++) : Présence forte

(++) : Présence moyenne ; (-) : Absence.

#### V.4. La courbe étalonnage



**Figure 45:** Courbe d'étalonnage de la capacité antioxydante totale des extraits, indique analyse quantitative des composés phénoliques de *Syzygium aromaticum* et l'*Eucalyptus globulus* est exprimée en nombre d'équivalents d'acide gallique.



**Figure 46:** Courbe d'étalonnage de Test d'activité anti-radicalaire (DPPH) indique analyse quantitative des composés flavonoïdes de *Syzygium aromaticum* et *Eucalyptus globulus* est exprimée en nombre d'équivalents de catéchine.

Sur l'ensemble des résultats obtenus, nous avons pu prendre une idée générale sur la composition chimique des plantes étudiées. En effet, nous pouvons conclure que l'*Eucalyptus globulus* est moins riche en métabolites secondaires que *Syzygium aromaticum*,

particulièrement l'extrait éthanolique qui a révélé la présence des familles chimiques; les polyphénols et les flavonoïde de concentration plus important dans l'*Syzygium aromaticum*.

#### **V.4.1. Capacité antioxydant totale (CAT)**

La capacité antioxydante totale des extraits étudiés est exprimée en nombre d'équivalents d'acide gallique à partir d'une courbe d'étalonnage. Les résultats obtenus sont exprimés en µg en parallèle à l'acide gallique par mg de l'extrait sec. C'est un test quantitatif puisque les résultats sont exprimés en nombre d'équivalents d'acide gallique. **(Bougandoura et Bendimerad, 2012).**

#### **V.4.2. Test d'activité anti-radicalaire (DPPH)**

Les activités anti-radicalaires des extraits de *Syzygium aromaticum* et d'*Eucalyptus globulus* et du témoin positif ont été déterminées par la méthode au DPPH. L'activité anti-radicalaire de nos l'extrait éthanolique de *Syzygium aromaticum* avait une forte activité anti radicalaire par rapport l'*Eucalyptus globulus*. **(Bougandoura et Bendimerad, 2012).**




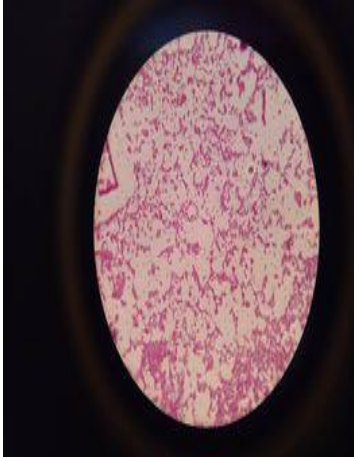
Les flavonoïdes et les tanins réduisent et décolorent le DPPH en raison de leur capacité à céder l'hydrogène **(Bougandoura et Bendimerad, 2012)**

### **V.5. Identification des bactéries**

#### **V.5.1. Identification macroscopique et microscopique**

Nous avons confirmé l'identification des souches testées par un examen macroscopique par des milieux sélectifs et ainsi que par un examen microscopique par la coloration de gram. Les résultats obtenus ont présenté dans le tableau 11.

**Tableau 11:** Résultats d'identification macroscopique et microscopique des souches utilisées

Souches	Résultats macroscopique	Résultats microscopique	Observations
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922			Gram- Bacilles Colonies rondes, plates et réguliers. <b>King A:</b> Pigment (jaune- vert fluorescent) La pyocyanine
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853			Gram- Fin bacille Bâtonnets <b>King A :</b> Pigment (jaune- vert fluorescent) La pyocyanine

## V.5.2. Test biochimiques

### V.5.2.1. Recherche de la catalase

**Résultats:** La présence de catalase se matérialise par une production de bulles. Les *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichiacoli* sont catalase positive.



**Figure 47:** Préparation de test catalase sur la lame



**Figure 48:** Dégagement immédiat de bulles d'oxygène exprime le test catalase (+) pour *Pseudomonas aeruginosa* (à droite) et *Escherchia coli* (à gauche).

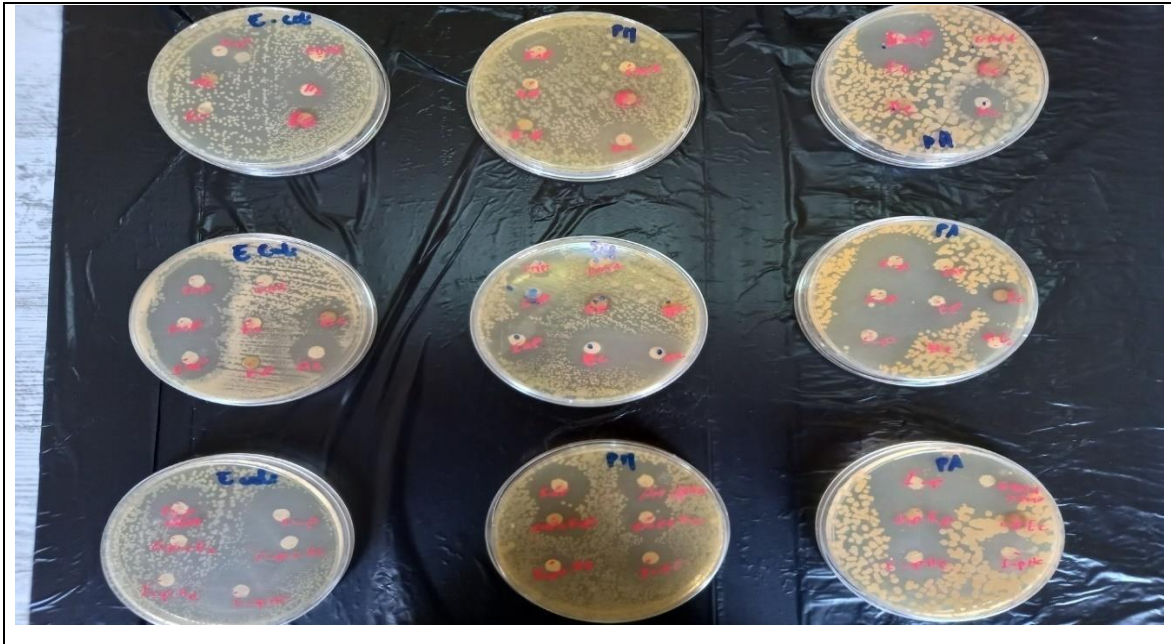
## V.6. Recherche des souches sécrétrices des metallo-bêta-lactamases

### V.6.1. Test à l'EDTA

La recherche des metallo-bêta-lactamases (MBLs) a été effectuée sur les souches résistantes à l'IPM en mettant à profit la faculté de l'éthylène-diamin-tetra-acetic-acid (EDTA), chélateur bivalent à restaurer l'activité de l'IPM en chélatant les ions  $Zn^{2+}$  indispensables à l'activité de la MBL et la rendant ainsi inactive. Deux techniques phénotypiques ont été réalisées afin de rechercher la présence probable de MBLs: Le test

IMP-EDTA (the combination disk test) (CDT) et le test de synergie avec doubles disques (DDST).

Le premier test réalisé pour étudier l'effet de *Syzygium aromaticum* et l'*Eucalyptus globulus* et Antibiotique est la méthode de diffusion de disques qui est une technique qualitative basée sur la détermination du diamètre des zones d'inhibition apparentées autour des disques chargés par les extraits testés.



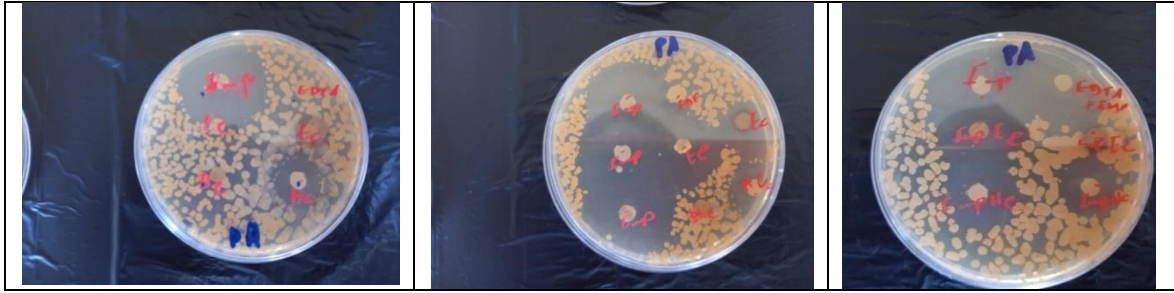
**Figure 49:** Activité antibactérienne (*Escherichia coli* , *Proteus mirabilis* et *pseudomonas aergenosa*) d'extrait éthanolique et huile essentielle de *Syzyguimaromaticum* , *Eucalyptus globulus* et *Imipénem*



**Figure 50:** Activité antibactérienne (*Escherichia coli* ) d'extrait éthanolique et huile essentielle de *Syzyguimaromaticum* , *Eucalyptus globulus* et *Imipénem*



**Figure 51:** Activité antibactérienne (*Proteus mirabilis*) d'extrait éthanolique et huile essentielle de *Syzyguimaromaticum* , *Eucalyptus globulus* et *Imipénem*



**Figure 52:** Activité antibactérienne (*Pseudomonas aeruginosa*) d'extrait éthanolique et huile essentielle de *Syzygium aromaticum*, *Eucalyptus globulus* et Imipénem

**Tableau 12:** Diamètres d'inhibition des différentes souches testées par Antibiotique Imipénem et la Synergie entre Imipénem les huiles essentielles et les extraits de *Syzygium aromaticum* et l'*Eucalyptus globulus* par la méthode de diffusion des disques

SOUCHE	IMP	EDTA	IMP+EDTA	IMP+HC	IMP+HE	IMP+EC	IMP+EE
<i>E. coli</i> ATCC 25922	17mm	5mm	18mm	18mm	15mm	22mm	20mm
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	22mm	3mm	20mm	15mm	18mm	15mm	20mm

**Tableau 13:** Diamètres d'inhibition des différentes souches testées par les huiles essentielles et les extraits de *Syzygium aromaticum* et l'*Eucalyptus globulus* par la méthode de diffusion des disques

Les Souches	HC	HE	EC	EE
<i>E. coli</i> ATCC 25922	5mm	15mm	13mm	16mm
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	7mm	5mm	10mm	20mm

Suite aux résultats indiquées dans le tableau 13, Huile essentielle et l'extrait éthanolique de *Syzygium aromaticum* a montré une activité plus au moins inhibitrice contre la souches *E. coli* ATCC 25922 *P. aeruginosa* ATCC 27853 à la concentration 25 mg/ml avec un diamètre inférieur à de 15 mm a montré une résistante, contrairement au l'extrait et huile essentielle de *Eucalyptus globulus* avec une concentrations de 25mg/ a montré une activité inhibitrice contre les souches étudiées à un diamtre qui dépasse 15mm

L'huile essentielle de la plante *Syzygium aromaticum* a montré une activité antibactérienne très modeste par rapport l'extrait éthanolique vis-à-vis les souches bactériennes testées qui ne dépasse pas les 10 mm. Cependant, les extraits, notamment de *Syzygium aromaticum* avec un diamètre qui atteint les 13 mm à la concentration 25mg/ml.

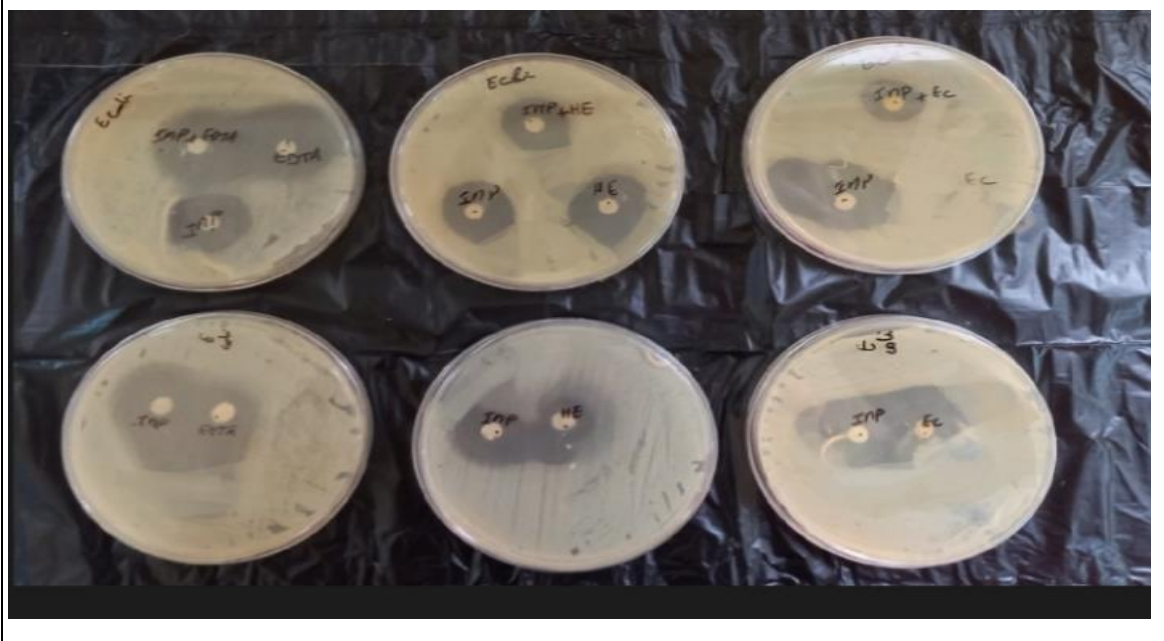
La remarque qui nous à poussé à réaliser le 2ème essai et nous permet à orienter vers une seule souche avec une seule plante pour le reste de protocole de semi-purification: ce



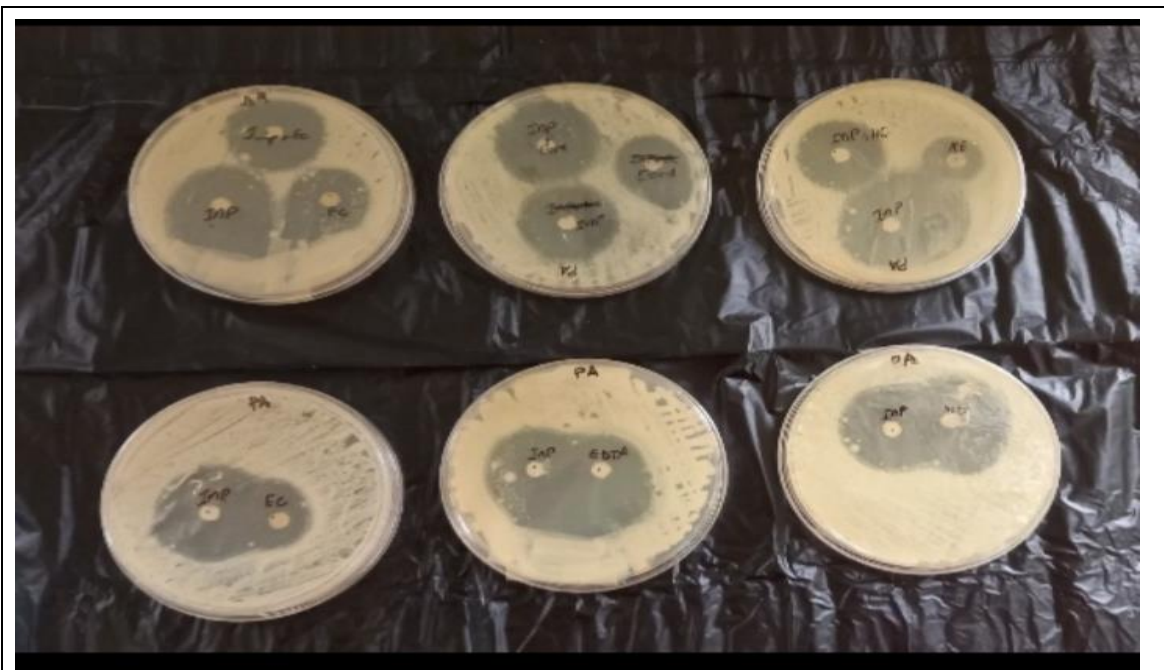
que chez la bactérie *Escherichia coli*, le *Syzygium aromaticum* avait un effet synergique avec antibiotique Imipénem.

2ème essai à été fait par la méthode d'écouvillonnage selon le protocole décrite précédemment, avec un changement léger de position des disques

**2ème essai**



**Figure 53:** Activité antibactérienne (*Escherichia coli*) d'extrait éthanolique, huile essentielle de *Syzygium romaticum* et Antibiotique Imipénem



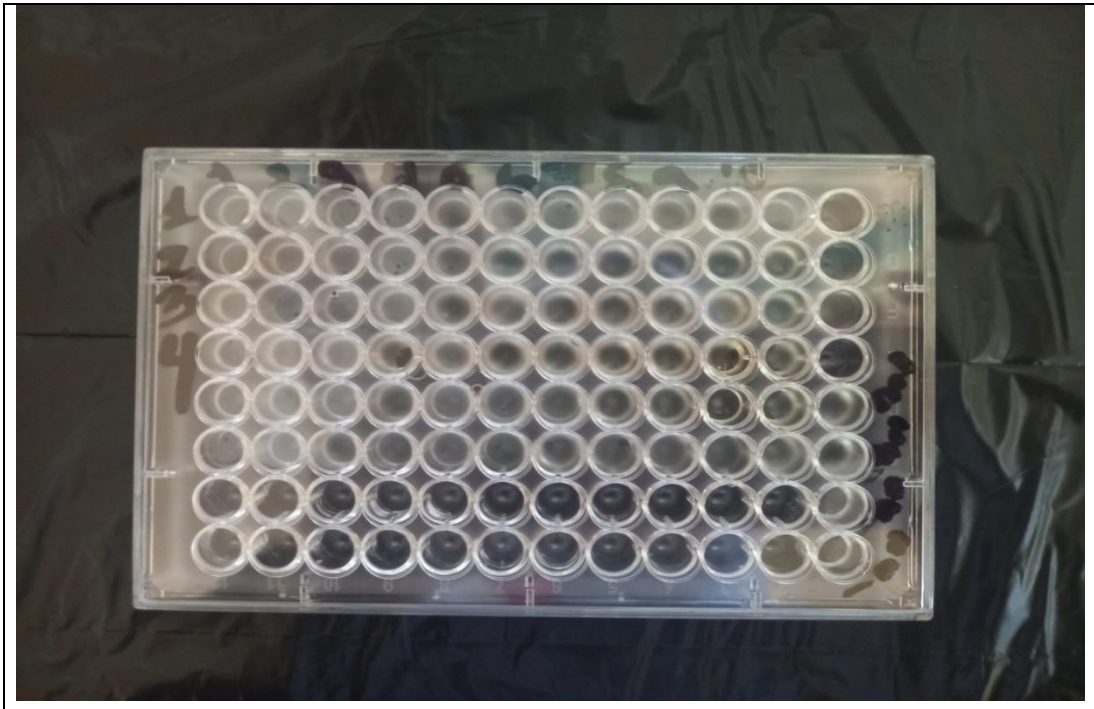
**Figure 54:** Activité antibactérienne (*Pseudomonas aeruginosa*) d'extrait éthanolique, huile essentielle de *Syzygium aromaticum* et Antibiotique Imipénem.

**Tableau 14:** Diamètres d'inhibition des différentes souches testées par les huiles essentielles et les extraits de *Syzygium aromaticum* et Imipénem par la méthode de diffusion des disques

Les souches	IMP	EDTA	HC	EC	IMP+HC	IMP+EC	<u>IMP+EDTA</u>
<i>E. coli</i> ATCC 25922	17mm	20mm	17mm	15mm	17mm	15mm	<u>20mm</u>
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	22mm	17mm	15mm	19mm	21mm	18mm	<u>22mm</u>

#### V.7. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)

Par la méthode des micro-dilutions sur milieu liquide: La technique utilisée a été décrite par CLSI en 2006.



**Figure 55:** Remplissage de microplaque pour la détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI de la souche *Escherchia coli* par les dilution des extraits éthanoliques et huile essentielle de *Syzygium aromaticum* et antibiotique Imipénem

**Tableau 15:** Concentrations minimales inhibitrices d'antibiotique imipénem

	2	1	0.5	0.25	0.125	0.062	0.031	0.015	0.0078	0.0039	CMI
E.coli ATCC25933	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1

**Tableau 16:** Concentrations minimales inhibitrices d'huile essentielle de *Syzygium aromaticum*

	50	25	12.5	6.25	3.125	1.562	0.78	0.39	0.195	0.0975	CMI
E.coli ATCC25933	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	0.8

**Tableau 17:** Concentrations minimales inhibitrices de l'extrait éthanolique de *Syzygium aromaticum*

	200	100	20	25	12.5	6.25	3.125	1.562	0.781	0.390	CMI
E.coli ATCC25933	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	1.2

Préparation de la gamme de concentration des extraits: La gamme de concentration des extraits a été préparée à partir d'une solution mère de la concentration, 2mg/ml pour

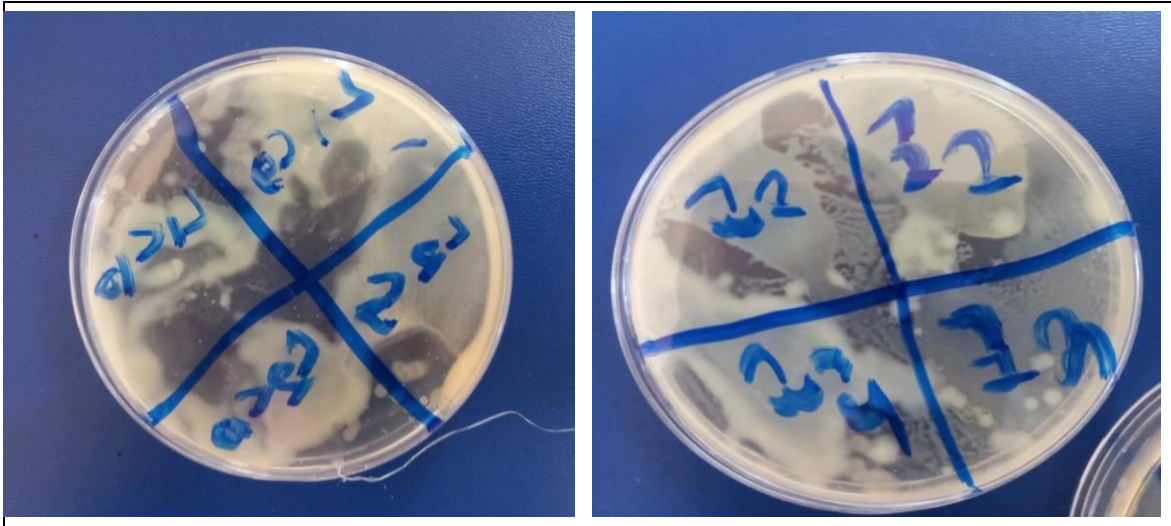
l'antibiotique imipénème, concentration de 50mg /ml de huile essentielle de *Syzygium aromaticum* et de 200mg/ml pour l'extrait éthanolique de *Syzygium aromaticum* dans 10 tubes à essais par la méthode de la double dilution (1/2) comme nous avons déjà mentionnée dans le tableau 17 plus la 10<sup>ème</sup> dilution. On a dilué les extraits dans les milieux de culture liquide utilisée (MH), concernant l'HE l'ajout de tween 80 dans la solution mère c'est nécessaire. Après la détermination de la CMI (durant 24h d'incubation à 37°C), les deux puits contenant les concentrations en extrait et HE strictement supérieures à la CMI vont servir pour la détermination de la CMB. Pour ce faire, un échantillon de 10 µl de chaque puits (ne présentant pas de croissance) va être transféré dans des boîtes de Pétri contenant du milieu Gélose nutritive. Les boîtes sont incubées dans une étuve à 37°C pendant 24 h. Cette technique nous permet de vérifier si les cellules sont viables et cultivables. La boîte de celle de la CMB renferme un nombre de colonies inférieur à 3 (Prescott et al., 1995).

D'autres études réalisées ont montré que les CMI de l'extrait méthanolique du romarin sont comprises entre 1,56 et 6,25 mg/ml vis-à-vis *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, (Al namer., 2014).

D'après les résultats obtenus, nous remarquons que les CMI varient de 0,8 mg/ml à 1.2 mg/ml pour toutes les composés testés (imipénem, l'extrait éthanolique de *Syzygium aromaticum* et huile essentielle de *Syzygium aromaticum*. D'après les CMI La souche elle est plus sensible de la plante *Syzygium aromaticum* soit en extrait éthanolique ou de huile essentielle.

### **V.8. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)**

La CMB est définie comme la plus faible concentration de l'antibactérien qui détruit 99,9% de la concentration cellulaire finale. Après la détermination de la CMI (durant 24h d'incubation à 37°C), les deux puits contenant les concentrations en huile essentielle strictement supérieures à la CMI vont servir pour la détermination de la CMB. Pour ce faire, un échantillon de 10 µl de chaque puits (ne présentant pas de croissance) va être transféré dans des boîtes de Pétri contenant du milieu Gélose nutritive. Les boîtes sont incubées dans une étuve à 37°C pendant 24 h. Cette technique nous permet de vérifier si les cellules sont viables et cultivables. La boîte de celle de la CMB renferme un nombre de colonies inférieur à 3 (Prescott et al., 1995).



**Figure 56:** Développement de la culture bactérienne *Escherichia coli* de huit puits sur boîtes de Pétri contenant du milieu Gélose nutritive incubé pour la Détermination de la concentration minimale bactéricide de huile essentielle de extrait éthanolique de *Syzygium aromaticum* (à droit) Antibiotique imipénem et la synergie (Imp+ EDTA ) (à gauche).

Après la détermination de la CMI (durant 24h d'incubation à 37°C), les deux puits contenant les concentrations en huile essentielle et d'antibiotique imipénem strictement supérieures à la CMI vont servir pour la détermination de la CMB. Pour ce faire, un échantillon de 10 µl de chaque puits (ne présentant pas de croissance) qui sont 9ème et 10ème dilution d'huile essentielle de *Syzygium aromaticum*, 9ème et 10ème de l'extrait éthanolique de *Syzygium aromaticum* ainsi la 1ère et la 2ème dilution d'antibiotique imipénem et la 1ère et la 2ème dilution de EDTA ajoutée à antibiotique imipénem, ces dilutions vont être transféré dans des boîtes de Pétri contenant du milieu Gélose nutritive. Les boîtes sont incubées dans une étuve à 37°C pendant 24 h.

La technique de CMB nous permet de vérifier si les cellules sont viables et cultivables, pour le reste de protocole on a besoin de concentration viable, cultivable et stimulante de la souche *Escherichia coli* pour la sécrétion d'enzyme métallo-β-lactamase pour le reste de protocole de semi-purification de métallo-β-lactamase.

D'après le teste de CMB qui nous prouvent la viabilité cellulaire dans la 2ème dilution d'antibiotique imipénem.

### V.9. Extrait semi-purifié de bêta-lactamases

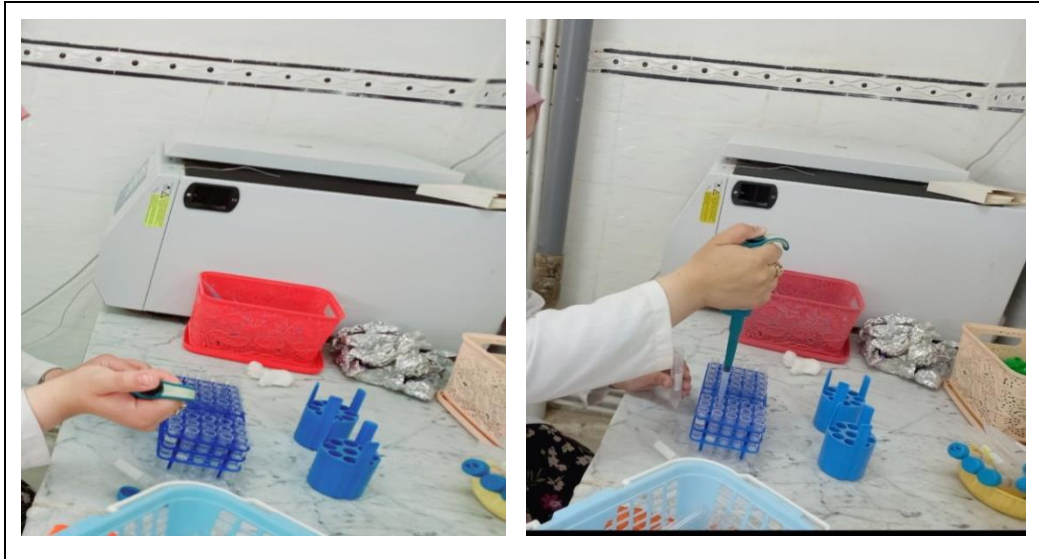
Extraction semi purifiés de bêta-lactamases ont été préparés, à partir de la souche *Escherichia coli* qui est avérée selon les résultats du test CDT, productrice de métallo-bêta-lactamases.

En pratique, 55.5 g de BHI sont rajoutés progressivement à un volume suffisant d'eau chaude pour 1.5 l. le bouillon obtenu est répartie sur six erlenmeyer de 1l de volume à raison de 250 ml par erlenmeyer. Après stérilisation (autoclave), 250 ml de bouillon sont inoculés au préalable par une seule colonie jeune de la souche de Escherichia coli puis incubée à 37°C pendant 18 h sous agitation.



**Figure 57:** Incubation de l'inoculum dans un Bains-marie à agitation à 37°C pendant 18 h

L'inoculum obtenu après incubation de 18h à 37° C'est utilisé pour ensemercer les cinq erlenmeyers à raison de 50 ml d'inoculum par erlenmeyer. Après addition de 0.5mg/ml d'imipenème à chaque erlenmeyer (pour induire la sécrétion des enzymes) et incubation de ces dernières dans les mêmes conditions, le milieu de culture est centrifugé à 3000 tr/min pendant 15 min. le surnageant est rejeté et les culots cellulaires sont nettoyer deux fois par Tampon phosphate PBS (phosphate buffered saline), puis introduit dans un 80 ml solution tampon (0.2 M tris-0.1 M Hcl-sacharose à 20 %). Le fractionnement cellulaire a été réalisé par double choc l'un osmotique et l'autre thermique au même temps. Concernant choc osmotique en utilisant une solution tampon (0.2 M tris + 0.1 M Hcl + sacharose à 20 %). Maintenant il est le rôle de choc thermique par incubation pendant 15 min et refroidissement rapide dans l'eau congelée pendant 15 min. Cette dernière étape est réalisée 3 fois successivement.



**Figure 58:** Nettoyage de culots cellulaires (après centrifugation à 3000 tr/min pendant 15 min) deux fois par Tampon phosphate PBS (phosphate buffered saline)

Les homogénats obtenus sont centrifugés à 10000 g pendant 40 min. à 4°C.



**Figure 59:** Ultracentrifugation de milieu par appareil ultracentrifuge réfrigérée à 4 °C

Les surnageant obtenus sont pool. Le pool (surnagent) est agité pendant 30 min par l'ajout 50.6 g de sulfate d'ammonium et lisser 1 heure pour l'homogénéisation. Le mélange est centrifugé à 17 000 g pendant 30 min à 4°C.



**Figure 60:** Ultracentrifugation de milieu par appareil ultracentrifuge réfrigérée à 4 °C

Les culots récupérés dans 50 ml du tampon (0.2 M tris +0.1 M Hcl) et ensuite dialysé contre le tampon (0.2 M tris +0.1 M Hcl) pendant 24 h et cette dernière étape est réalisée 3 fois. Le dialysat, constitue notre extrait semi-purifié de bêta-lactamases et est répartie dans des tubes eppendorf à raison de 200 µl par tube puis conservé à (-20°C) jusqu'à utilisation.



**Figure 61:** Les culots récupérés dans 50 ml du tampon (0.2 M tris +0.1 M Hcl)



## *Conclusion Général*

### **Conclusion & Perspectives**

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques. L'objectif de notre travail consiste à faire une étude biologique des substances bioactives de *Syzygium aromaticum* et *L'Eucalyptus globulus* (huile essentielle, extrait éthanolique).

La préparation des extraits de *L'Eucalyptus globulus* et *Syzygium aromaticum* a été effectuée par des différentes méthodes d'extraction et des solvants à différentes polarités (hexane et éthanol). Cette extraction a permis d'obtenir deux extraits bruts: extrait hexanique, l'extrait éthanolique. Le rendement de l'extrait éthanolique était de 7,37%, l'extrait hexanique était de 6,12% pour *Eucalyptus globulus* et cependant il était de 8.65% de l'extrait éthanolique et 7% de celui hexanique pour *Syzygium aromaticum*. Cependant, les huiles essentielles ont marqué le rendement le plus faible par un pourcentage de 1,60% de *Syzygium aromaticum* et 1.24% de *Eucalyptus globulus*.

Au terme de cette étude et à travers les résultats obtenus il apparaît que l'activité biologique des extraits et les huiles essentielles de *Syzygium aromaticum* et d'*Eucalyptus globulus* sont caractérisées par un fort pouvoir antimicrobien vis-à-vis des souches bactériennes pathogènes.

Les résultats ont indiqué que l'extrait éthanolique de *Syzygium aromaticum* possède une bonne activité antimicrobienne contre les souches étudiées avec une synergie importante avec l'antibiotique Imipénem. La mise en évidence des composés présents dans les plantes médicinales ont un effet inhibiteur de ces extraits sur des mettalo-bêta-lactamases isolées d'une souche bactérienne de *Escherchiacoli* et *Pseudomonas aeruginosa*. Nos résultats sont très prometteurs en ce qui concerne la lutte contre le phénomène de l'antibiorésistance qui devient aujourd'hui un problème de santé publique.

Cette étude aura donc permis d'un point de vue fondamental de mieux connaître l'importance d'extraits et les huiles essentielles de *Syzygium aromaticum* et d'*Eucalyptus globulus*, mais elle reste néanmoins préliminaire, des recherches plus approfondies s'avèrent nécessaires pour éclaircir certains points et découvrir d'autres pistes de recherche. Nos perspectives de recherche à venir sont:

- Détermination des paramètres de la cinétique enzymatique et d'inhibition.
- Etude de l'effet inhibiteur de ces extraits sur différentes mettalo-bêta-lactamases isolées à partir d'autres souches bactériennes pathogènes.
- Recherche d'autres activités des extraits de cette plante.

***Références bibliographiques***

---

## VI. Références bibliographiques

1. Achaaban, M. R., Mouloud, M., Tligui, N. S., & El Allali, K. (2016). Main anatomical and histological features of the tonsils in the camel (*Camelus dromedarius*). *Tropical animal health and production*, 48(8), 1653-1659.
2. Akila, G. (2019). *Effet d'un extrait lyophilisé de clou de girofle (Syzygium aromaticum) sur le profil lipidique et les statuts redox et inflammatoires, chez des rats présentant un diabète ou une hypercholestérolémie* (Doctoral dissertation, Université de Tlemcen).
3. Akula, R., & Ravishankar, G. A. (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant signaling & behavior*, 6(11), 1720-1731.
4. Ambler, R. P. (1980). The structure of  $\beta$ -lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 289(1036), 321-331.
5. Avril, M. F., Charpentier, P., Margulis, A., & Guillaume, J. C. (1992). Regression of primary melanoma with metastases. *Cancer*, 69(6), 1377-1381.
6. Aylward, F. O., Burnum-Johnson, K. E., Tringe, S. G., Teiling, C., Tremmel, D. M., Moeller, J. A., ... & Currie, C. R. (2013). *Leucoagaricus gongylophorus* produces diverse enzymes for the degradation of recalcitrant plant polymers in leaf-cutter ant fungus gardens. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(12), 3770-3778.
7. Bachir, R. G., & Benali, M. (2008). Antibacterial activity of leaf essential oils of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus camaldulensis*. *African journal of Pharmacy and pharmacology*, 2(10), 211-215.
8. Barros, L., Baptista, P., & Ferreira, I. C. (2007). Effect of *Lactarius piperatus* fruiting body maturity stage on antioxidant activity measured by several biochemical assays. *Food and chemical toxicology*, 45(9), 1731-1737.
9. Bessedik, M., Benbouzid-Si Tayeb, F., Cheurfi, H., & Blizak, A. (2016). An immunity-based hybrid genetic algorithms for permutation flowshop scheduling problems. *The International Journal of Advanced Manufacturing Technology*, 85(9), 2459-2469.
10. Bora, A., Sanjana, R., Jha, B. K., Narayan Mahaseth, S., & Pokharel, K. (2014). Incidence of metallo-beta-lactamase producing clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in central Nepal. *BMC research notes*, 7(1), 1-7.
11. Bouchouka, E. (2016). Extraction des polyphénols et étude des activités antioxydante et antibactérienne de quelques plantes Sahariennes. *Badji Mokhtar Annaba University— Faculty of Sciences*.
12. Bougandoura, N., & Bendimerad, N. (2012). ANTIFUNGAL ACTIVITY OF AQUEUOUS AND METHANOL EXTRACTS OF *Satureja calaminthassp.* (Nepeta) briq. *Revue des bio ressources*, 2(1), 7-7.
13. Boukhalfoun, L. (2012). Extraction des composés actifs chez *Eucalyptus globulus*.
14. Boukhatem, M. N., Ferhat, M. A., Kameli, A., & Mekarnia, M. (2018). *Eucalyptus globulus* (Labill.): un arbre à essence aux mille vertus.
15. Bruyère, F., Melen-Lamalle, L., Blacher, S., Roland, G., Thiry, M., Moons, L., ... & Noël, A. (2008). Modeling lymphangiogenesis in a three-dimensional culture system. *Nature methods*, 5(5), 431-437.
16. Cao, Y., Paner, G. P., Perry, K. T., Flanigan, R. C., Campbell, S. C., & Picken, M. M. (2005). Renal neoplasms in younger adults: analysis of 112 tumors from a single

- institution according to the new 2004 World Health Organization classification and 2002 American Joint Committee on Cancer Staging System. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 129(4), 487-491.
17. Cristian, C., Jacky, B., Eddy, S., Salavert, M., & Armand, T. (2008). Microbiologie Hygiène Base microbiologiques de la diététique. *TEC & DOC Lavoisier, Paris*, 76-86.
  18. El Boujnouni, A. (2020). Histoire de la Résistance Bactérienne aux Antibiotiques.
  19. Fadhila, B. Activité antibactérienne de l'huile essentielle de deux épices: *Syzygium Aromaticum* et *Illicium Verum*.
  20. Fagbemi, K., Jigot, L., Bankole, H. S., & Aclinou, E. (2010). *Importance de l'examen au gram dans l'étude cyto bactériologique des urines*. EPAC/UAC.
  21. Fernández, J., Guerra, B., & Rodicio, M. R. (2018). Resistance to carbapenems in non-typhoidal *Salmonella enterica* serovars from humans, animals and food. *Veterinary sciences*, 5(2), 40.
  22. Frankel, A. S., Clark, C. W., Herman, L., & Gabriele, C. M. (1995). Spatial distribution, habitat utilization, and social interactions of humpback whales, *Megaptera novaeangliae*, off Hawai'i, determined using acoustic and visual techniques. *Canadian Journal of Zoology*, 73(6), 1134-1146.
  23. Garmendia, J., Frankel, G., & Crepin, V. F. (2005). Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation. *Infection and immunity*, 73(5), 2573-2585.
  24. Gaspar, R. S., da Silva, S. A., Stapleton, J., Fontelles, J. L. D. L., Sousa, H. R., Chagas, V. T., ... & Paes, A. M. D. A. (2020). Myricetin, the main flavonoid in *Syzygium cumini* leaf, is a novel inhibitor of platelet thiol isomerases PDI and ERp5. *Frontiers in pharmacology*, 10, 1678.
  25. Ghedira, K., Goetz, P., & Le Jeune, R. (2010). *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry (Myrtaceae) Giroflier. *Phytotherapie*, 8(1), 37-43.
  26. Ghert, M., Schneider, P., Giglio, V., McKay, P., Duong, A., Evaniew, N., ... & Sailor, L. (2022). Comparison of prophylactic intravenous antibiotic regimens after endoprosthetic reconstruction for lower extremity bone tumors: a randomized clinical trial. *JAMA oncology*, 8(3), 345-353.
  27. Goetz, P., & Ghedira, K. (2012). Mécanisme d'action antibactérienne des huiles essentielles. In *Phytothérapie anti-infectieuse* (pp. 193-208). Springer, Paris.
  28. Goly, K. R. C., Soro, Y., Dadié, A., Kassi, A. B. B., & Djé, M. (2015). Antibacterial activity of essential oils and extracts from the leaves of *Hyptis suaveolens* and *Lippia multiflora* on multi-resistant bacteria. *Rasayan Journal of Chemistry*, 8(4), 396-403.
  29. Gupta V. Metallo beta lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species Expert Opin. Investig. Drugs 17:131-143, (2008).
  30. Haddoudi, M., Mellouk, H., Bejjany, B., Dani, A., & Digua, K. (2014). Valorisation du marc du café: extraction de l'huile et évaluation de son activité antioxydante. *Les technologies de laboratoire*, 8(36).
  31. Handa, S. S. (2008). An overview of extraction techniques for medicinal and aromatic plants. *Extraction technologies for medicinal and aromatic plants*, 1, 21-40.

32. Houchi, S. (2018). *Les Métallo-Beta-Lactamases-Recherche de souches bactériennes productrices-Essais d'inhibition de l'activité enzymatique relative par trois flavonoïdes commerciaux et deux extraits de Terminalia chebula* (Doctoral dissertation).
33. Imane, R., & Khaoula, B. I. (2001). Etude bibliographique sur l'effet des plantes médicinales sur les maladies cardiovasculaires.
34. Jeannot, K., & Plésiat, P. (2016). Épidémiologie de la résistance aux  $\beta$ -lactamines chez *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal des Anti-infectieux*, 18(2), 52-63.
35. Kallaba, M. B. (2017). *Etude des sites métalliques et modélisation de la réactivité des métallo- $\beta$ -lactamases par des calculs de chimie quantique* (Doctoral dissertation, Université Montpellier; Université Tunis El Manar. Faculté des Sciences Mathématiques, Physiques et Naturelles de Tunis (Tunisie)).
36. Karnwal, A. (2009). Production of indole acetic acid by fluorescent *Pseudomonas* in the presence of L-tryptophan and rice root exudates. *Journal of plant Pathology*, 61-63.
37. Kumar, V., Parvatam, G., & Ravishankar, G. A. (2009). AgNO<sub>3</sub>: a potential regulator of ethylene activity and plant growth modulator. *Electronic Journal of Biotechnology*, 12(2), 8-9.
38. Labiod, A., Ceugniet, F., Ibraikulov, O. A., Dabos, S., Heiser, T., Cabanetos, C., ... & Lévêque, P. (2016). Accepteurs non dérivés de fullerènes pour le photovoltaïque organique.
39. Lasgaa, A., & Rezgui, C. (2021). Effet antifongique des composants majoritaires d'huile essentielle de la plante *Eucalyptus*.
40. Lasgaa, A., & Rezgui, C. (2021). Effet antifongique des composants majoritaires d'huile essentielle de la plante *Eucalyptus*.
41. Lim, J. A., Shin, H., Heu, S., & Ryu, S. (2014). Exogenous lytic activity of SPN9CC endolysin against gram-negative bacteria. *Journal of microbiology and biotechnology*, 24(6), 803-811.
42. Lobstein, A., Couic-Marinier, F., & Koziol, N. (2018). Huile essentielle d'*Eucalyptus globulus*. *Actualités Pharmaceutiques*, 57(573), 59-61.
43. Maamar, B., Abdelmalek, R., Messadi, A. A., & Thabet, L. (2019). Étude épidémiologique des infections à entérobactéries productrices de carbapénémases chez les brûlés. *Annals of Burns and Fire Disasters*, 32(1), 10.
44. Mahindrakar, K. V., & Rathod, V. K. (2020). Ultrasonic assisted aqueous extraction of catechin and gallic acid from *Syzygium cumini* seed kernel and evaluation of total phenolic, flavonoid contents and antioxidant activity. *Chemical Engineering and Processing-Process Intensification*, 149, 107841.
45. Majiduddin, F. K., Materon, I. C., & Palzkill, T. G. (2002). Molecular analysis of beta-lactamase structure and function. *International journal of medical microbiology*, 292(2), 127-137.
46. Mao, Y., Zhang, H., Xu, N., Zhang, B., Gou, F., & Zhu, J. K. (2013). Application of the CRISPR-Cas system for efficient genome engineering in plants. *Molecular plant*, 6(6), 2008-2011.
47. Marchal, R. (1999). Rôle des bactéries sulfurogènes dans la corrosion du fer. *Oil & Gas Science and Technology*, 54(5), 649-659.

48. Medfouni, R., Hafsi, N., & Mazouz, W. (2018). Contribution à l'étude phytochimique et les activités biologiques d'une plante médicinale *Syzygium aromaticum*.
49. Menif, E., Allani, H., Saddoud, N., Baccar, S., Noura, K., Messaoud, M. B., ... & Hachicha, S. (2005). ORL5 Voies de diffusion endocranienne de la pathologie rhinosinusienne et des espaces profonds de la face. *Journal de Radiologie*, 86(10), 1546.
50. Meyer, F. E., Shuey, L. S., Naidoo, S., Mamni, T., Berger, D. K., Myburg, A. A., ... & Naidoo, S. (2016). Dual RNA-sequencing of *Eucalyptus nitens* during *Phytophthora cinnamomi* challenge reveals pathogen and host factors influencing compatibility. *Frontiers in Plant Science*, 7, 191.
51. Mittal, R., Wagener, M., Breed, E. R., Liang, Z., Yoseph, B. P., Burd, E. M., ... & Ford, M. L. (2014). Phenotypic T cell exhaustion in a murine model of bacterial infection in the setting of pre-existing malignancy. *PLoS One*, 9(5), e93523.
52. Nadjette, L. (2021). *Polyphénols totaux et activité antibactérienne des extraits de la plante médicinale Ammi visnaga L* (Doctoral dissertation, UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF-M'SILA).
53. Namer, A., & Musleh, R. M. (2014). Valorisation pharmacologique de la *Rosmarinus Officinalis* et de la *Vandula Officinalis*: Toxicité aiguë, potentiel psychotrope et antibactérien.
54. Nauciel, C., & Vildé, J. L. (2005). *Bactériologie médicale*. Elsevier Masson.
55. Nouadri, F. Z., Remache, S., & Arhab, R. (2018). Evaluation in vitro de l'activité antibactérienne des produits purifiés synthétisés sur les bases de schiff.
56. Noura, B., & Siham, Y. (2017). Etude l'effet de sol sur la qualité et la quantité des huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus* en deux régions différentes (AL ABADIA, AIN ELTURCK).
57. Pachori, P., Gothalwal, R., & Gandhi, P. (2019). Emergence of antibiotic resistance *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit; a critical review. *Genes & diseases*, 6(2), 109-119.
58. Palacios, A. R., Rossi, M. A., Mahler, G. S., & Vila, A. J. (2020). Metallo- $\beta$ -lactamase inhibitors inspired on snapshots from the catalytic mechanism. *Biomolecules*, 10(6), 854.
59. Peter, J. K., Kumar, Y., Pandey, P., & Masih, H. (2014). Antibacterial activity of seed and leaf extract of *Carica papaya* var. Pusa dwarf Linn. *Journal of Pharmacy and Biological sciences*, 9(2), 29-37.
60. Petrosino, J., Cantu III, C., & Palzkill, T. (1998).  $\beta$ -Lactamases: protein evolution in real time. *Trends in microbiology*, 6(8), 323-327.
61. Popovici, J., Walker, V., Bertrand, C., Bellvert, F., Fernandez, M. P., & Comte, G. (2011). Strain specificity in the Myricaceae–*Frankia* symbiosis is correlated to plant root phenolics. *Functional Plant Biology*, 38(9), 682-689.
62. Porter, J., Galanello, R., Saglio, G., Neufeld, E. J., Vichinsky, E., Cappellini, M. D., ... & Rose, C. (2008). Relative response of patients with myelodysplastic syndromes and other transfusion-dependent anaemias to deferasirox (ICL670): a 1-yr prospective study. *European journal of haematology*, 80(2), 168-176.
63. Prescott, L. M. (1995). Doxil offers hope to KS sufferers. *Journal of the International Association of Physicians in AIDS Care*, 1(11), 43-44.

64. Prescott, V. E., & Hogan, S. P. (2006). Genetically modified plants and food hypersensitivity diseases: usage and implications of experimental models for risk assessment. *Pharmacology & therapeutics*, *111*(2), 374-383.
65. Rabehaja, D. J., Ihandriharison, H., Ramanoelina, P. A., Ratsimamanga-Urverg, S., Bighelli, A., Casanova, J., & Tomi, F. (2013). Leaf oil from *Vepris madagascariensis* (Rutaceae), source of (E)-anethole. *Natural Product Communications*, *8*(8), 1934578X1300800835.
66. Ramzi, A., & Kamouche Abderrahim, M. I. (2021). Thème: Evaluation du pouvoir antiradicalaire des extraits de quelques épices (*Cuminum cyminum*, *Curcuma longa* et *Syzygium aromaticum*).
67. Sihem, M. Profil de sensibilité aux antibiotiques des Entérobactéries uropathogènes (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*).
68. Somboro, A. M., Osei Sekyere, J., Amoako, D. G., Essack, S. Y., & Bester, L. A. (2018). Diversity and proliferation of metallo- $\beta$ -lactamases: a clarion call for clinically effective metallo- $\beta$ -lactamase inhibitors. *Applied and Environmental Microbiology*, *84*(18), e00698-18.
69. Sougakoff, W., & Trystram, D. (2003). Résistances aux  $\beta$ -lactamines. *Service de Bactériologie-Hygiène du CHU Pitié-Salpêtrière*, 9-12.
70. Soumeiya, D. J. E. N. H. I. (2021). *Caractérisation pharmacologique et effet antimicrobien de quelques plantes médicinales* (Doctoral dissertation, university center of abdalhafid boussouf-MILA).
71. Stoczko, M., Frère, J. M., Rossolini, G. M., & Docquier, J. D. (2008). Functional diversity among metallo- $\beta$ -lactamases: characterization of the CAR-1 enzyme of *Erwinia carotovora*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *52*(7), 2473-2479.
72. Sutour, S. (2010). *Etude de la composition chimique d'huiles essentielles et d'extraits de menthe de Corse et de Kumquats* (Doctoral dissertation, Université de Corse).
73. Wink, M. (2013). Evolution of secondary metabolites in legumes (Fabaceae). *South African Journal of Botany*, *89*, 164-175



Resume

5

31

45

48

53

54

57

68

75

76

81