



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



**Université Dr. MOULAY TAHAR-Saida-**  
**Faculté des sciences**  
**Département de Biologie**

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

**Mémoire présenté en vue l'obtention du diplôme:**

**Master en Biologie**

**Spécialité : Microbiologie Appliquée**

## **Thème**

**Contribution à l'étude de l'inhibition de l'activité  
enzymatique relative des Métallo-Bêta-  
Lactamases par des extraits des feuilles d'*Olea  
europaea* chez *Pseudomonas aeruginosa***

**Présenté par : M<sub>r</sub>. BOUMEDIENE Hamza**

**M<sub>r</sub>. MEHALHAL Abd elsamed**

**Soutenue publiquement le 28 /06/2016**

**Devant le jury :**

<b>HAMANI Houari</b>	<b>Maitre de conférences B</b>	<b>Président</b>
<b>ZIANI Kaddour</b>	<b>Maitre assistant A</b>	<b>Examineur</b>
<b>HALLA Nouredine</b>	<b>Maitre assistant A</b>	<b>Encadreur</b>

**Année Universitaire : 2015-2016**

# Remerciements

*En préambule à ce mémoire, nous souhaitons adresser nos remerciements les plus sincères aux personnes qui nous ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire.*

*Nous tenons à remercier chaleureusement Mr Halla Noureddine maître-assistant à l'université Dr Moulay Tahar Saïda en tant que promoteur de mémoire, pour avoir accepté de diriger ce travail, pour ses précieux conseils, son aide, ses suggestions sur la rédaction de ce mémoire ainsi que la confiance qu'il m'a témoigné tout au long de cette étude.*

*Nous tenons à exprimer notre reconnaissance envers Mr Ziani Kaddour maître-assistant à l'université Dr Moulay Tahar Saïda qui a eu la gentillesse de lire et d'examiner ce travail.*

*Nous sommes conscientes de l'honneur que nous a fait Mr Hamani houari maître de conférences à l'université Dr Moulay Tahar Saïda en étant président du jury. Nous aimerions exprimer notre gratitude et nos remerciements à tous les membres de jury.*

*Enfin, nous adressons nos remerciements à notre promotion, à tous nos proches et amies (Slïmani Hamza, Semmani Abdhamid, Berber Mohamed, Hamdi Zoubida, Abdoun Laounia, Temer Amina, Aid Imane, Dadi Soumeya, Houari samira, hamidi fatiha) qui nous ont toujours soutenues et encouragées au cours de la réalisation de ce mémoire.*

*Merci à toutes et à tous...*

# Dédicaces

*Je dédie ce modeste travail, fruit de mes études:*

*A*

*Mes très chers et adorables parents qui m'ont toujours fort encouragé et aider dans la recherche du savoir durant tout mon parcours avec beaucoup de tendresse de dévouement de gentillesse d'amour, et leurs affections et qui ont toujours éclairés chemins. Que Dieu leur procure bonne santé et longue vie.*

*Mes frères Kadda et son enfants (Rania, Amina, lina) Ahmed son enfant (Abd elkader) et Mohamed, à mes soeurs Mokhtarria et Kheira , qu'ils m'ont donnée et pour leurs précieux encouragements.*

*Mon binôme, Mehalhal abd elsamed, qui est pour moi un vrai frère.*

*Toute ma famille, à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.*

*Je vous dis merci.*

*Hamza.*

# *Dédicaces*

*Je dédie ce travail*

*A mes parents, et surtout ma chère mère,  
d'avoir suivi tout ce travail, et d'y être  
intéressé, pour votre aide quotidienne, votre  
soutien sans faille, dans les moments faciles,  
comme dans les difficiles, dans les moments de  
doute et de remises en question, d'avoir  
partagé de nombreux moments avec moi, et  
pour votre amour et votre gentillesse sans  
bornes.*

*A mes sœurs et mes frères et mes touts la  
famille...*

*A mes amis...*

*Abd elsamed*

## ABSTRACT

Resistance to the carbapénèmes within the *Pseudomonas* kind, brought back in an increasing way in the whole world, is generally related to the production of beta-lactamases of the metal-worker-beta-lactamases type. Studies show that a number of species of the *Pseudomonas* kind have naturally on their chromosome of genes coding for carbapénèmases and thus constitute the tank of it. These most widespread enzymes become and most significant at *P. aeruginosa*. Have in their active site a cation essential to their activity which is invariably Zinc. Moreover, the activity of these enzymes is inhibited by the addition of chelating of bivalent ions (EDTA). In fact metal-worker-enzymes have a catalytic activity much stronger than other beta-lactamases and hydrolize all the beta-lactam antibiotics except the aztréonam. The solution for the threat these bacteria would be to find compounds who have chelating properties for inhibit metal-worker-beta-lactamases specifically but of shown therapeutic potential (tolerable and not poison on the organization).we, tried in our work to seek a possible inhibiting effect of the activity of metal-worker-beta-lactamase to leave two extracts are prepared: one starting from the sheets of olive-tree (*Olea europaea*) using ethanol with 80% during 3:00, and the extraction was repeated three times, one recovers the extract by a vacuum evaporation of organic solvent and the other semi-purified extracts of beta-lactamases, starting from a stock *Pseudomonas aeruginosa* (clinical isolates) identified, by test CDT (Combined Disk Test Imipenème-EDTA) who only consists of the incubation of these last in the presence of imipenème and imipenème more EDTA. The comparison of the zones of inhibition obtained following the application of this test, and shows that the stock like producing of metal-worker and serine-beta-lactamases by a diameter of the zone of inhibition (superior à13 mm). The quantitative analyzes and qualitative show that the semi-purified extract of beta-lactamases starting from *Pseudomonas aeruginosa* is rich in proteins, and its enzymatic activity is sensitive to the EDTA, hydrolizes penicillin, beta-lactamases contained can there be thus of the type MBL which is inhibited compétitivement by the extract of the sheets of olive-tree (*Olea europaea*).

**Key words:** Metal-beta-lactamase, Imipeneme, the extract of the sheets of olive-tree, *Pseudomonas aeruginosa*

## ملخص

المقاومة للكاربابينيمات في جنس *Pseudomonas* ذكرت على نحو متزايد في جميع أنحاء العالم وغالبا ما ترتبط بإنتاج بيتالاكتاماز من بيتالاكتاماز فلزية. لقد أظهرت الدراسات أن عددا من الأنواع من جنس *Pseudomonas* تملك بطبيعة الحال على صيغياتها جينات ترمز ل carbapenemases وبالتالي تشكل الخزان. وأصبحت هذه الانزيمات الأكثر انتشارا والأكثر أهمية عند *pseudomonas aeruginosa* لديها في موقع النشاط كاتيون ضروري لنشاطهم الذي هو دائما الزنك. وبالإضافة إلى ذلك، فإن كبح نشاط هذه الأنزيمات يتم من خلال إضافة أيونات ثنائي التكافؤ (EDTA). هذه هي الانزيمات فلزية، والتي لها نشاط محفز أقوى بكثير من غيرها من بيتالاكتاماز وتحلل جميع بيتا لاكتام إلا أرتريونام. الحل لخطر هذه البكتيريا سيكون للعثور على المركبات التي لها خصائص chélateur لمنع تحديدا فلزية بيتالاكتاماز لكن بإمكانيات علاجية (مقبولة وغير سامة للجسم). وقد حاولنا في عملنا البحث عن تأثير كبح ممكن لنشاط فلزية بيتا لاكتاماز عن طريق اثنين من مستخرجات أعدت: واحد من أوراق الزيتون ( *Olea europaea* )، مع دي الإيثانول 80% لمدة 3 ساعات، ويكرر الاستخراج ثلاث مرات، تم يسترد المستخرج عن طريق التبخر تحت الضغط للمذيبات العضوية وغيرها من مستخرجات شبه نقيته من بيتالاكتاماز من *pseudomonas aeruginosa* سلالة (العزلات السريرية) التي حددها اختبار CDT (القرص المشترك اختبار إيميبيينيم-EDTA). الذي يتوقف على تحضين هذه الأخير في وجود إيميبيينيم وحيد وإيميبيينيم بالإضافة إلى EDTA. مقارنة بين مناطق تثبيط التي تم الحصول عليها بعد تطبيق هذا الاختبار، وبدل على أن السلالة المنتجة للفلزية وسيرين بيتالاكتاماز من قبل قطر منطقة التثبيط (يفوق 13 ملم). وتشير التحليلات الكمية والنوعية أن مستخرج شبه نقيه من بيتا لاكتاماز من *pseudomonas aeruginosa* غني بالبروتين ونشاطها الانزيمي حساس لل EDTA، البنسلين المائي. أو بيتالاكتاماز الواردة فيه يمكن أن يكون نوع من MBL التي تكبح بمنافسة من مستخلص أوراق الزيتون (*Olea europaea*)

**كلمات البحث:** فلزية بيتا لاكتاماز، إيميبيينيم، مستخلص أوراق الزيتون، *Pseudomonas aeruginosa*

## Résumé

La résistance aux carbapénèmes au sein du genre *Pseudomonas*, rapportée de manière croissante dans le monde entier, est le plus souvent liée à la production de bêta-lactamases de type métallo-bêta-lactamases. Les études montrent qu'un certain nombre d'espèces du genre *Pseudomonas* possèdent naturellement sur leur chromosome des gènes codant pour des carbapénémases et en constituent donc le réservoir. Ces enzymes devenues les plus répandues et les plus significatives chez *P. aeruginosa*. Elles possèdent dans leur site actif un cation indispensable à leur activité qui est invariablement le Zinc. En outre, l'activité de ces enzymes est inhibée par l'addition de chélateur d'ions bivalents (EDTA). Ce sont des métallo-enzymes, qui ont une activité catalytique beaucoup plus forte que les autres bêta-lactamases et hydrolysent toutes les bêta-lactamines sauf l'aztréonam. La solution pour la menace ces bactéries serait de trouver des composés qui ont des propriétés chélatrices pour inhibent spécifiquement les métallo-bêta-lactamases avec un potentiel thérapeutique démontré (tolérable et non toxique sur l'organisme). Nous avons, essayé dans nos travaux de rechercher un éventuel effet inhibiteur de l'activité de métallo-bêta-lactamase à partir deux extraits sont préparés : l'un à partir des feuilles d'olivier (*Olea europaea*) à l'aide de d'éthanol à 80% pendant 3 h, et l'extraction a été répétée trois fois, on récupère l'extrait par une évaporation sous vide du solvant organique et l'autre extraits semi-purifiés de bêta-lactamases, à partir d'une souche *Pseudomonas aeruginosa* (isolats cliniques) identifiées, par le test CDT (Combined Disk Test Imipenème-EDTA) qui consiste en l'incubation de ces dernières en présence d'imipenème seul et d'imipenème plus EDTA. La comparaison des zones d'inhibition obtenues suite à l'application de ce test, et montre que la souche comme productrices de métallo et de sérine-bêta-lactamases par un diamètre de la zone d'inhibition (supérieur à 13 mm). Les analyses quantitatives et qualitatives montrent que l'extrait semi-purifié de bêta-lactamases à partir de *Pseudomonas aeruginosa* est riches en protéines, et son activité enzymatique est sensible à l'EDTA, hydrolyse pénicilline; la ou les bêta-lactamases y contenues peuvent être donc du type MBL qu'est inhibé compétitivement par l'extrait des feuilles d'olivier (*Olea europaea*).

**Mots clés:** Métallo-bêta-lactamase, Imipenème, l'extrait des feuilles d'olivier, *Pseudomonas aeruginosa*

## SOMMAIRE

REMERCIEMENTS.....	II
DEDICACES.....	III
ABSTRACT .....	V
LISTE DES TABLEAUX .....	XI
LISTE DES FIGURES .....	XII
LISTE DES ABREVIATIONS.....	XV
INTRODUCTION.....	01

### Revue bibliographique

<b>Chapitre 1 Résistance aux bêta-lactamines.....</b>	<b>05</b>
<b>1. Les bêta-lactamines :.....</b>	<b>06</b>
1.1. Définition : .....	06
1.2. Mode d'action des bêta-lactamines :.....	06
<b>2. Production de bêta-lactamases:.....</b>	<b>07</b>
2.1. Définition des bêta-lactamases:.....	07
2.2. Classification :.....	07
2.2.1. Classification structurale (classification d'Ambler) : .....	08
2.2.1.1. Les serine-bêta-lactamases : .....	08
2.2.1.1.1. Les bêta-lactamases de classe A: .....	08
2.2.1.1.2. Les bêta-lactamases de classe C: .....	08
2.2.1.1.3. Les bêta-lactamases de classe D: .....	09
2.2.1.1.4. Structure :.....	09
2.2.1.1.5. Mécanisme d'action: .....	12
2.2.1.1.6. Inhibiteurs : .....	13
2.2.1.2. Les metallo-bêta-lactamases :.....	13
2.2.1.2.1. Les bêta-lactamases de classe B: .....	13
2.2.2. Classification fonctionnelle (Bush, Jacoby et Medeiros, 1995) : .....	13
<b>Chapitre 2. Pseudomonas aeruginosa &amp; Les métallobêta-lactamases.....</b>	<b>14</b>
<b>1 Pseudomonas aeruginosa.....</b>	<b>15</b>
1.1 Taxonomie, classification.....	15
1.2 Habitat .....	15
1.3 Caractères bactériologiques.....	16

2	Mécanisme de résistance aux $\beta$ -lactamines chez de <i>P. aeruginosa</i> .....	17
2.1	Résistance par production de $\beta$ -lactamases de classe B.....	17
2.2	Classification.....	18
2.2.1	Sous-classe B1:.....	18
2.2.1.1	Les MBLs de type IMP.....	18
2.2.1.2	Les MBLs de type VIM.....	18
2.2.1.3	Les MBLs de type SPM.....	19
2.2.1.4	Les MBLs de type GIM.....	19
2.2.1.5	Les MBLs de type FIM-1.....	19
2.2.2	Sous-classe B2:.....	19
2.2.3	Sous-classe B3:.....	19
2.3	Les profils d'activité.....	20
2.4	Structure.....	20
2.4.1	Structure moléculaire commune.....	20
2.4.2	Différence de structure.....	22
2.4.3	Structure du site actif.....	23
2.5	Mécanisme d'action.....	25
2.5.1	Cas du site actif mono-nucléaire :.....	26
2.5.2	Cas du site actif bi-nucléaire :.....	27
2.6	Inhibiteurs.....	28
	<b>Chapitre 3 Plante étudiée.....</b>	<b>30</b>
1.	L'olivier.....	31
1.2.	Classe botanique.....	31
2.2.	Distribution géographique.....	31
2.	Les feuilles d'olivier.....	32
2.2.	Composition des feuilles d'olivier.....	32
3.	Les composés phénoliques des feuilles d'olivier.....	34
3.1.	Définition et localisation des composés phénoliques.....	34
3.2.	Classification des composés phénoliques.....	35

3.3.	Activités biologiques des composés phénoliques .....	35
3.4.	Composition des feuilles d'olivier en composés phénoliques .....	37
3.5.	Intérêts des feuilles d'olivier pour la santé humaine.....	38
4.	L'oleuropéine 39	
4.1.	Action antimicrobienne .....	40
	<b>Partie expérimentation.....</b>	<b>41</b>
	<b>Matériel et methode.....</b>	<b>42</b>
1.	<b>Matériels.....</b>	<b>43</b>
1.1.	Matériel végétal.....	43
1.2.	Souche étudiées.....	43
2.	<b>Méthodes.....</b>	<b>43</b>
2.1.	Préparation de l'extrait.....	43
2.2.	Préparation d'extrait d'éthanol de 80% et les fractions.....	43
3.	Prélèvement, isolement, et identification.....	44
3.1.	Prélèvement.....	44
3.2.	Isolement et purification.....	44
3.3.	Identification .....	45
3.3.1.	Productions des pigments .....	45
3.3.2.	Examen microscopique .....	45
3.3.3.	Test biochimiques .....	46
4.	Recherche des souches sécrétrice metallo-bêta-lactamases.....	49
	Test à l'EDTA .....	49
5.	Extrait semi-purifié de bêta-lactamases.....	50
6.	Analyse quantitative des protéines dans les extraits semi-purifiés de bêta-lactamases.....	51
7.	Test d'inhibition des metallo-bêta-lactamase par l'extrait des feuillets d'Olea europaea.....	51

### **Résultat et Discussion**

1.	Resultats des tests biochimique.....	54
2.	Test à l'EDTA.....	56
3.	Extraits semi-purifiés de bêta-lactamases.....	57
3.1.	Analyse quantitative des protéines .....	56
4.	inhibition des metallo-bêta-lactamase par l'extrait des feuillets d'Olea europaea.....	58

Conclusion & Perspectives.....	60
Références bibliographiques.....	61
Annexes.....	69

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1 :</b> les résidus d'acides aminés des éléments conservés du site actif des trois sous-classes serine-bêta-lactamase (SBLs) ( <b>CHARLIER ET AL., 1998</b> ).....	10
<b>Tableau 2 :</b> Les résidus d'acides aminés du site actif des trois sous-classes MBLs coordonnés avec les ions du zinc ( <b>GALLENIE ET AL., 2001</b> ).....	24
<b>Tableau 3:</b> Composition chimique global des feuilles d'olivier (exprimé en g par 100 g) selon plusieurs auteurs. ....	32
<b>Tableau 4 :</b> Composition en acides aminées des feuilles d'olivier fraîche (exprimé en g par Kg d'azote total) selon ( <b>MARTIN-GARCIA ET MOLINA-ALCOIDE, 2008</b> ).....	33
<b>Tableau 5 :</b> Composition en minéraux des feuilles d'olivier (exprimé en g par Kg de matière sèche) selon ( <b>FEGEROS ET AL., 1995</b> ).....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
<b>Tableau 6 :</b> Classification des composés phénoliques selon ( <b>HARBORNE ET SIMMONDS, 1964</b> ).....	35
<b>Tableau 7:</b> Données qualitatives et quantitatives des principaux composés phénoliques identifiés dans un extrait des feuilles d'olivier selon ( <b>BENAVENTE-GARCIA ET AL., 2000</b> ). ....	36
<b>Tableau 8 :</b> Tableau montre resultat des tests biochimique de pseudomonas aeruginosa.....	57

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1 :</b> La structure reconstituée d'une serine-bêta-lactamase classe A (SHV-1) (DRAWZ ET BONOMO, 2010).....	11
<b>Figure 2 :</b> La structure reconstituée d'une serine-bêta-lactamase classe D (OXA-1) (DRAWZ ET BONOMO, 2010).....	11
<b>Figure 3 :</b> Schéma réactionnel de l'ouverture du cycle bêta-lactame (BARRIAL ET SCOTET, 2006).....	13
<b>Figure 4 :</b> structures 3D représentant MBLs. Les $\alpha$ -spirales sont montrées en pourpre et jaune, $\beta$ - feuilles en vert et rouge et ions de $Zn^{2+}$ en tant que sphères rouges. (a) Sous-classe B1, IMP-1, (b) Sous-classe B2, CphA. (c) Sous-classe B3, L1. (BEBRONE ET AL., 2007 ; HERZBERG ET FITZGERALD, 2006).....	21
<b>Figure 5:</b> Représentant typique de poche du site actif de la MBL (IMP-1). Figure a été créé avec le logiciel Maestro ( <a href="http://www.schrodinger.com/Maestro">www.schrodinger.com/Maestro</a> ). (WALTER ET SUTTON, 2013).....	22
<b>Figure 6 :</b> Structure représentative du site actif dans MBL. (a) Sous-classe B1, IMP-1. (b) Sous-classe B2, CphA. (c) Sous-classe B3, L1. (BEBRONE, 2007 ; HERZBERG ET FITZGERALD, 2006).....	23
<b>Figure 7 :</b> Mécanisme d'hydrolyse des beta-lactames par une MBL de la sous-classe B1 (BCII mononucléaire) proposé par Karsisiotis et ses collaborateurs. (1): mécanisme de formation du complexe de Mechaelis, (2): mécanisme de clivage de la liaison C-N du cycle bêta-lactames (ouverture du cycle), (3): dissociation du complexe produit-enzyme (KARSISIOTISET AL., 2014). ....	26
<b>Figure 8 :</b> Mécanisme d'hydrolyse des beta-lactames par une MBL de la sous-classe B1 (BCII bi-nucléaire) proposé par Karsisiotis et ses collaborateurs (2014). (1) : mécanisme de formation du complexe de Mechaelis, (2): mécanisme de clivage de la liaison C-N du cycle beta-lactames (ouverture du cycle), (3): dissociation du complexe produit-enzyme (Karsisiotiset <i>al.</i> , 2014).....	27
<b>Figure 9 :</b> Olivier.....	30

<b>Figure 10</b> : Zones de répartition géographique de la culture de l'olivier dans le bassin Méditerranéen (GHEDIRA, 2008).....	31
<b>Figure 11</b> : Formules brute et chimique d'une fonction phénol .....	34
<b>Figure 12</b> : Effets biologiques des polyphénols (MARTIN ET ANDRIANTSITOHAINA, 2002).....	36
Figure 13 : Structure moléculaire de l'oleuropéine. ....	40
<b>Figure 14</b> : Extraction des feuilles d'olive par Soxhlet (A gauche) et Evaporation sous vide par rotavapor de type Heidolph (A droite). ....	44
<b>Figure 15</b> : La mise en évidence de la fluorescence sur milieu Cétrimide sous UV 366nm.....	54
<b>Figure 16</b> : l'observation microscopique après coloration de gram.....	54
<b>Figure 17</b> : la zone d'inhibition de la croissance de bactéries testée sur Gélose Mueller Hinton, après 16 à 18 h d'incubation en présence d'imipenème seul (10µg) et d'imipenème (10µg) plus EDTA. ....	55
<b>Figure 18</b> : Courbe d'étalonnage de BSV pour le dosage de protéines totales.....	56
<b>Figure 19</b> : Courbe de lineweaver-burk tracées en fonction de l'inverse des vitesses d'hydrolyses de concentrations finales croissantes de pénicilline G par l'extrait semi-purifié à partir de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	57
<b>Figure 20</b> : schéma représente le mécanisme d'inhibition compétitive.....	59

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>PLP</b>	<b>Protéines Liant les Pénicillines</b>
<b>PM</b>	<b>Poids Moléculaire</b>
<b>SBLs</b>	<b>Serine-Bêta-Lactamases</b>
<b>MBL</b>	<b>Métallo-Bêta-Lactamase</b>
<b>KDa</b>	<b>Kilodalton</b>
<b>OXA</b>	<b>Oxacilline</b>
<b>CDT</b>	<b>Combined Disk Test</b>
<b>BHI</b>	<b>Brain Heart Infusion</b>
<b>BSA</b>	<b>Albumine Sérique Bovine</b>
<b>CphA</b>	<b>Cephalosporinase</b>
<b>DIM</b>	<b>Dutch IMipenemase</b>
<b>EDTA</b>	<b>Acide Ethylène Diamine Tétracétique</b>
<b>FEZ</b>	<b>Fluoribacter Endogenous Zinc beta-lactamase</b>
<b>FIM</b>	<b>Florence IMipenemase</b>
<b>GIM</b>	<b>German IMipenemase</b>
<b>SFB</b>	<b>Shewanella Frigidimarina classe B</b>
<b>Sfh</b>	<b>Serratia fonticola carbapenem hydrolase</b>
<b>SIM</b>	<b>Seoul IMipénémase</b>
<b>TMB</b>	<b>Tripoli Métallo-Bêta-Lactamase</b>

# *Introduction*

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 (**WALSH, 2003**). Selon le National Institute of Health, les maladies infectieuses représentent la seconde cause de décès et la première cause de perte d'années de vie productives à travers le monde (**FAUCI, 2001**).

Les antibiotiques constitué une véritable révolution pour le traitement des maladies infectieuses d'origine bactérienne. Depuis leur première utilisation en 1942, les bêta-lactamines représentent la principale 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 et à leur faible coût pour certaines molécules (**LIVERMORE, 1995**).

Cependant, l'utilisation massive et parfois abusive des antibiotiques, soit dans la communauté ou à l'hôpital, modifie considérablement l'écologie microbienne et tend à augmenter le taux de bactéries résistantes. Le développement de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries constitue un véritable problème de santé publique dont les conséquences se mesurent en termes de difficultés thérapeutiques accrues dans certaines situations cliniques.

Plusieurs mécanismes de résistance ont été décrits parmi lesquels la modification de la cible (Protéines liants Pénicillines) qui les rend moins sensibles aux bêta-lactamines mais permet de maintenir son activité physiologique normale ; la synthèse des enzymes (beta-lactamases) qui inactivent les bêta-lactamines par modification chimique ; l'acquisition ou la surproduction des pompes efflux qui peuvent expulser l'antibiotique hors de la cellule même contre le gradient de concentration et la modification des porines chez les bactérie à Gram-négatif, ayant pour résultat la diffusion plus lente des bêta-lactamines à travers la membrane externe (**GALLENI ET AL., 1995 ; NIKAIDO, 1998 ; LAKAYE ET AL., 1999 ; WALSH, 2003**).

Les bacilles à Gram négatif particulièrement les bactéries du genre *Pseudomonas* occupent une place très importante parmi les germes responsables d'infections nosocomiales. Ces bactéries ont un niveau de résistance naturel élevé, Parmi les mécanismes de résistance produisant des bêta-lactamases, ces enzymes ont été

identifiées dans les années 1940 (ABRAHAM ET COLL. 1940) en catalysent de manière efficace et irréversible l'hydrolyse de la liaison amide du cycle  $\beta$ -lactame des antibiotiques de la famille des bêta-lactamines, donnant un produit biologiquement inactif qui perd totalement son activité antimicrobienne (MATAGNE ET AL., 1998).

Ces enzymes sont divisées en deux grands groupes, les sérine-bêta-lactamases et les métallo-bêta-lactamases dont l'activité revient essentiellement à l'acide aminé sérine du site actif et à un ou deux atomes de zinc, dans l'ordre. Plus de 80 métallo-bêta-lactamases distinctes ont été identifiées dans le monde; 75% d'entre eux sont codées par des plasmides. Ils posent donc une double menace clinique et par la capacité de se propager et par la capacité de dégrader tous les carbapénèmes, qui ne sont pas dégradables par la plupart des sérine-bêta-lactamases.

La solution pour la première menace serait d'adopter des règles d'hygiène stricte. Pour la deuxième menace la solution serait de trouver des composés qui non seulement inhibent spécifiquement les métallo-bêta-lactamases mais de potentiel thérapeutique démontré (tolérable et non toxique sur l'organisme). Dans ce contexte, nous avons, essayé dans nos travaux de rechercher un éventuel effet inhibiteur de l'activité d'un extraits semi-purifié d'une métallo-bêta-lactamase à partir d'un isolat clinique de *Pseudomonas aeruginosa* par l'extraits des feuilles d'*Olea europaea*.

*Première partie*

*Revue  
bibliographique*

# *Chapitre 1*

*Résistance aux*

*bêta-lactamines*

## 1. Les bêta-lactamines :

### 1.1. Définition :

Les bêta-lactamines (pénicillines, céphalosporines, carbapénèmes et monobactames), constituent la famille d'antibiotiques la plus importante dans le monde, aussi bien par le nombre de molécules disponibles et la diversité des molécules utilisables, que par leurs indications en thérapeutique et en prophylaxie des infections bactériennes. Cette utilisation importante est due à leur large spectre d'action, à leur efficacité, à leur faible toxicité et à leur faible coût pour de nombreuses molécules (**LIVERMORE AND WOODFORD, 2006**).

L'histoire des bêta-lactamines débute dans les années 1930 par les observations de Sir Alexander Fleming concernant un agent antibactérien dénommé pénicilline isolé à partir du champignon *Penicillium notatum* (**FLEMING, 1929**). Il faudra attendre le début des années 1960 pour voir apparaître les premières synthèses de bêta-lactamines permettant leur développement à l'échelle industrielle (**ROLINSON ET COLL, 1998**). Cependant, l'utilisation large des bêta-lactamines depuis plus de 60 ans s'est accompagnée d'une augmentation importante de la résistance bactérienne à ces antibiotiques; et le développement de nouveaux antibiotiques, notamment contre les bactéries à Gram négatif, connaît un franc ralentissement depuis plus de 10 ans (**ROLINSON ET COLL, 1998**).

### 1.2. Mode d'action des bêta-lactamines :

Les bêta-lactamines agissent à l'étape finale de la synthèse de la paroi bactérienne (peptidoglycane), en empêchant la catalyse des réactions de synthèse de peptidoglycane par les carboxypeptidases, transglycosylases et les transpeptidases. Ces enzymes, appelées protéines liant les pénicillines (PLP), sont les cibles des bêta-lactamines (**ESSAK, 2001; GAUDY ET BUXERAUD, 2005**).

Les bêta-lactamines présentent une analogie structurale avec un constituant du peptidoglycane en formation, le dipeptide D-ala-D-ala qui est le substrat naturel de ces enzymes. Les bêta-lactamines se fixent de façon covalente au niveau du site actif de l'enzyme par réaction d'acylation. La liaison PLP-bêta-lactamines ainsi formée a deux conséquences : elle empêche la synthèse du peptidoglycane en inhibant la transglycosylation et la transpeptidation (effet bactériostatique) et elle entraîne une activation endogène des autolysines bactériennes (effet bactéricide) (**ESSAK, 2001; GAUDY ET BUXERAUD, 2005**).

## 2. Production de bêta-lactamases:

### 2.1. Définition des bêta-lactamases:

Les bêta-lactamases sont des hydrolases, appartenant à la famille d'enzymes EC 3.5.2.6, dont la première enzyme a été identifiée en 1940 comme des enzymes capables de neutraliser les propriétés antibactériennes de la pénicilline (**ABRAHAM ET CHAINE, 1940**). Elles représentent le mécanisme le plus utilisé pour la résistance bactérienne aux bêta-lactamines (**BUSH, 1989 ; BONOMO ET AL., 1995 ; ESSACK, 2001**).

Les bêta-lactamases sont, généralement, extracellulaires chez les bactéries Gram+ ou périplasmiques chez les bactéries Gram-. De rares cas de liaison à la membrane cytoplasmique ont été signalés, chez les mycobactéries, on retrouve une forte proportion d'enzymes dans la couche d'acides mycoliques (**MATAGNE ET AL., 1998 ; WILKE ET AL., 2005 ; MAITI ET AL., 2006**).

Les gènes des bêta-lactamases peuvent être chromosomiques ou plasmidiques, et portés parfois par des transposons. La présence des gènes sur ces éléments génétiques transférables facilite évidemment leur dissémination dans le monde bactérien. L'expression des gènes de bêta-lactamases est constitutive ou inductible (**FRERE, 1995 ; CHARLIER ET AL., 1998**).

### 2.2. Classification :

En raison de la diversité des caractéristiques enzymatiques de nombreuses bêta-lactamases découvertes jusqu'à présent, plusieurs classifications ont été proposées depuis les années 60 (**BUSH, 1989 ; SAMAHA-KFOURY ET ARAJ, 2003**). Actuellement, la classification fonctionnelle de Bush *et al.* et la classification structurale d'Ambler sont considérées comme étant les plus pertinentes (**LAVIGNE ET AL., 2002**).

#### 2.2.1. Classification structurale (classification d'Ambler) :

En 1980, Ambler a proposé une classification basée sur la structure primaire des bêta-lactamases. Ne contenant initialement que quatre classes. Les classes A, C et D sont composées d'enzymes à sérine active et se différencient les unes des autres par les séquences des éléments conservés du site actif. Les enzymes de classes B ou (métallo-enzymes, métallo-bêta-lactamases) se caractérisent par l'absence de site sérine active et la présence d'un ou deux atomes de zinc au niveau du site actif (**AMBLER, 1980**).

### 2.2.1.1. Les serine-bêta-lactamases :

#### 2.2.1.1.1. Les bêta-lactamases de classe A:

Les bêta-lactamases de classe A, d'origine chromosomique ou plasmidique, Elles sont généralement caractérisées par un poids moléculaire (PM) moyen de 29 KDa (**PHILIPPON ET AL., 1998**), se caractérisent par leur capacité à hydrolyser l'amide cyclique lié à la molécule de bêta-lactame. Cette activité hydrolytique, assurée par une sérine conservée (Ser-70) un fort taux de résistance aux pénicillines, céphalosporines et carbénicillines et induit la formation d'acide penicilloïque pour la pénicilline et de céphalosporoïque pour les céphalosporines.

Toutefois, les bêta-lactamases de classe A sont généralement fortement sensibles à les inhibiteurs de bêta-lactamases (l'acide clavulanique, tazobactam) (**Livermore. 1995**). Cette sérine est retrouvée dans le site actif de la bêta-lactamase qui se compose d'hélices  $\alpha$  entourées de cinq feuillets  $\beta$  anti-parallèles (**Knox. 1995**). Divers variant des bêta-lactamases de classe A ont été identifiés et caractérisés chez différents isolats cliniques.

#### 2.2.1.1.2. Les bêta-lactamases de classe C:

Les bêta-lactamases de classe C, décrites en 1981 par Jaurin et Grundstrom, ont longtemps été ubiquitaires aux chromosomes de différentes espèces bactériennes entériques (**JAURIN ET GRUNDSTROM. 1981**). Ces céphalosporinases sont généralement produites de façon constitutive et ce, à bas niveau, et ne contribuent que faiblement à la résistance aux bêta-lactamines. Toutefois, différentes mutations peuvent engendrer une surexpression conférant un fort taux de résistance. Différentes espèces, dont *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii* et *Pseudomonas aeruginosa* (**Sanders. 1989**). Ces céphalosporinases possèdent un mécanisme hydrolytique permettant d'inactiver l'anneau beta-lactame et, contrairement aux bêta-lactamases de classe A, ces enzymes confèrent une résistance intrinsèque aux inhibiteurs et aux céphalosporines de deuxième génération (**FRERE, 1995**).

#### 2.2.1.1.3. Les bêta-lactamases de classe D:

Les bêta-lactamases de classe D se distinguent par leur capacité à hydrolyser les pénicillines isoxazolyl (oxacilline) et la méthicilline. Ces gènes sont fréquemment observés sur les plasmides de plusieurs espèces entériques. Elles sont retrouvées fréquemment chez *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter spp.* (OXA-11, 14, 16, 17 et 19) et peu chez les entérobactéries (**Livermore. 1995**).

**2.2.1.1.4. Structure :**

Les serine-bêta-lactamases sont toutes des protéines globulaires monomériques. Leur structure secondaire comprend 11 hélices  $\alpha$  et 5 feuillets  $\beta$  (BABIC ET AL., 2006). Leur structure tertiaire comprend à son tour deux domaines, un tout en hélice, l'autre un mélange d'hélice  $\alpha$  et de feuillets  $\beta$  alternées. Toutes les serine-bêta-lactamases possèdent une structure tertiaire en sandwich du type  $\alpha/\alpha\beta$ . Le site actif se trouve dans l'espace existant entre les deux domaines de la structure en sandwich (Fig. 1, 2).

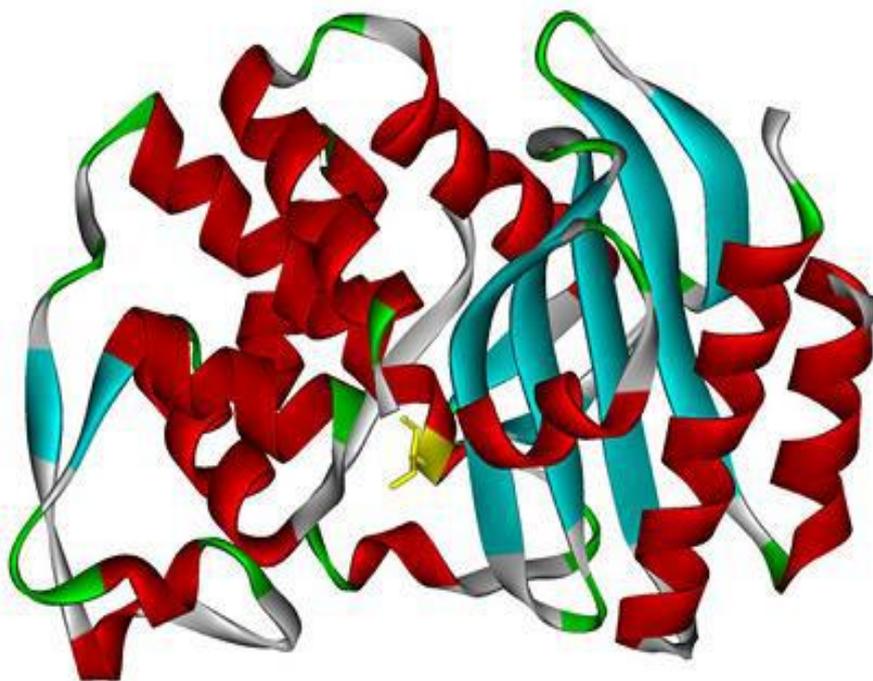
La comparaison des structures primaires des serine-bêta-lactamases montre l'existence d'acides aminés de fonction et ou de nature conservée entrant dans la composition de quatre éléments formant le site actif de ces enzymes (Tab. 1).

- L'élément 1 est une tétrade d'acide aminé: lys-X-X-ser où X est un acide aminé variable.
- L'élément 2 est une triade d'acide aminé: Asp-X-tyr (classe C et D) ou Asn-Asp-Ser.
- L'élément 3 est une triade également: Gly-Thr-Lys.
- L'élément 4 est formé d'un seul acide aminé, le glutamate. Confondus, ils participent directement ou indirectement dans l'hydrolyse du bêta-lactamine (CHARLIER ET AL., 1998).

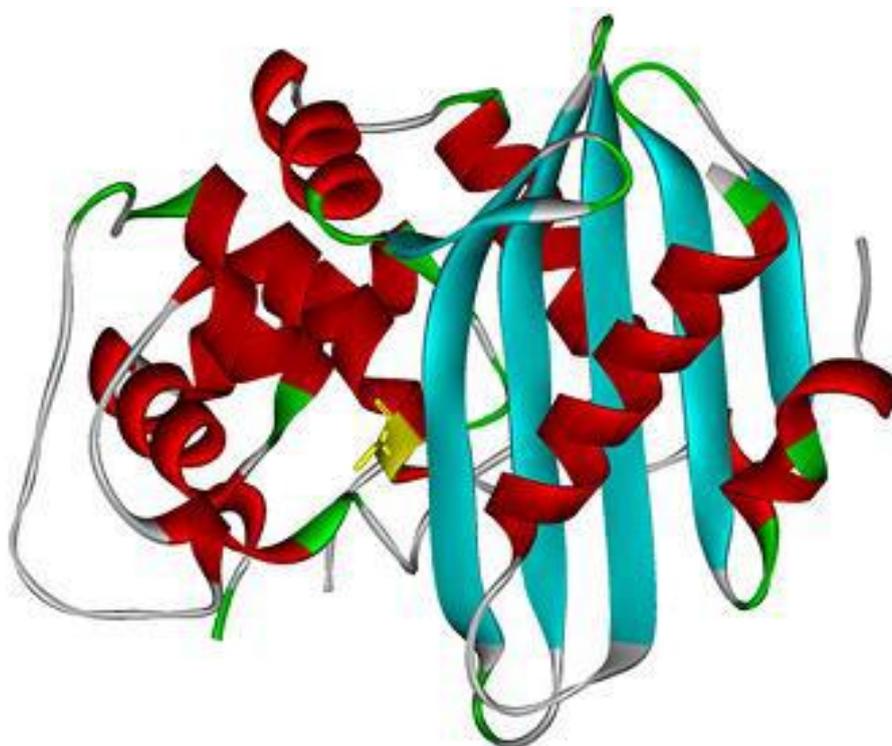
**Tableau 1 :** les résidus d'acides aminés des éléments conservés du site actif des trois sous-classes serine-bêta-lactamase (SBLs) (CHARLIER ET AL., 1998).

Les classes	Les éléments			
	1	2	3	4
A	KXXS	NDS / SDS	KTG / KRS	E
C	KXXS	YXN	KTG	n.d*
D	KFTS	YAN	KTG	n.d*

\* : non déterminé, K : Lysine, S : Serine, F : phenyl-alanine, T : Threonine, N : Asparagine, D : acide aspartique, Y : tyrosine, A : Alanine, G : glycine, R : arginine, E : acide glutamique, X : acide aminé variable.



**Figure 1 :** La structure reconstituée d'une serine-bêta-lactamase classe A (SHV-1) (DRAWZ ET BONOMO, 2010).



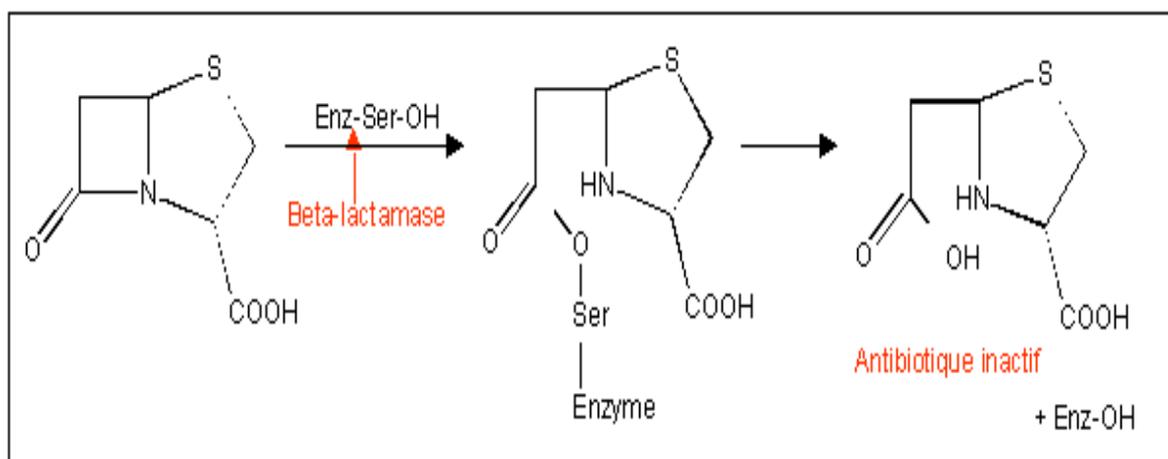
**Figure 2 :** La structure reconstituée d'une serine-bêta-lactamase classe D (OXA-1) (DRAWZ ET BONOMO, 2010).

### 2.2.1.1.5. Mécanisme d'action:

Les bêta-lactamases catalysent de manière efficace et irréversible l'hydrolyse du pont amide de l'anneau bêta-lactame des pénicillines, des céphalosporines, des monobactames et des carbapénèmes. Pour donner un acylenzyme qui sera ensuite dégradé en acide inactif. Ainsi, les pénicillines sont dégradées en acide pénicilloïque et les céphalosporines en acide céphalosporoïque (**MEDEIROS, 1984**).

Les serine-bêta-lactamases catalysent le clivage de la liaison amide du cycle bêta-lactame par l'intermédiaire d'un résidu serine de leur site actif dans une réaction de trois étapes (**SABBAGH, 1998; CHEN ET HERZBERG, 2000; MINASOV ET AL., 2002**).

- Première étape, l'enzyme et le bêta-lactamine interagissent pour constituer le complexe non-covalent de Michaelis-Menten.
- Deuxième étape dite étape d'acylation, suite à une attaque nucléophile du carbonyle du cycle bêta-lactame par le groupement hydroxyle de l'acide aminé serine, il se forme un complexe acyl-enzyme covalent.
- troisième étape dite étape de désacylation, l'intervention d'une molécule d'eau préalablement activé ou déprotoné par un acide aminé qui peut être un lysine, ou glutamate, ou un tyrosine, entraîne la dissociation du complexe acyl-enzyme et formation de composés acides tels que l'acide pénicilloïque ou l'acide céphalosporoïque qui a titre indicatif sont inactifs.



**Figure 3 :** Schéma réactionnel de l'ouverture du cycle  $\beta$ -lactame (**BARRIAL ET SCOTET, 2006**).

### 2.2.1.1.6. Inhibiteurs :

Les inhibiteurs des serine-bêta-lactamases ont été développés afin de neutraliser la production bactérienne de bêta-lactamases. Les premières recherches sur la découverte des inhibiteurs des bêta-lactamases débutèrent vers la fin des années 1960 et c'est en 1976 qu'est découvert l'acide clavulanique produit par une souche de *Streptomyces clavuligerous* (**BROWN ET COLL. 1976**). En 1981, une combinaison de l'acide clavulanique avec de l'amoxicilline, suivie peu de temps après par une combinaison entre l'acide clavulanique et la ticarcilline sont commercialisées. La découverte de l'acide clavulanique et son introduction dans la pratique médicale ont été suivies par la découverte de plusieurs inhibiteurs de bêta-lactamases comme le sulbactam et le tazobactam (**ROLINSON ET COLL. 1998**).

Les inhibiteurs des bêta-lactamases possèdent une activité antibiotique généralement faible. Ce sont des substrats-suicide qui se lient de manière irréversible à la bêta-lactamase, empêchant l'action de celle-ci sur les bêta-lactamines. Ceci explique pourquoi les inhibiteurs des bêta-lactamases, en particulier l'acide clavulanique et le tazobactam, ne sont généralement pas utilisés seuls, mais en association avec un antibiotique comme l'amoxicilline, la ticarcilline ou la pipéracilline. Le sulbactam possède, en plus de son effet inhibiteur irréversible sur les bêta-lactamases, une activité antibiotique intrinsèque sur quelques espèces bactériennes comme *A. baumannii*. Malgré leur intérêt en pratique médicale, les inhibiteurs des bêta-lactamases ne permettent pas d'inactiver l'ensemble des bêta-lactamases produites par les bactéries (**PADAYATTI ET AL., 2005**).

### 2.2.1.2. Les metallo-bêta-lactamases :

#### 2.2.1.2.1. Les bêta-lactamases de classe B:

Les bêta-lactamases de classe B sont des métallo-bêta-lactamases et utilisent un ion de zinc ( $Zn^{2+}$ ) comme cofacteur permettant ainsi la décomposition de l'anneau bêta-lactame (**AMBLER. 1980 ; BANDO ET AL. 1991**). Ces enzymes ont été émergés depuis une dizaine d'années, d'abord chez *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii*, puis ensuite chez les entérobactéries et d'autres bacilles Gram négatif comme *Pseudomonas stutzeri* ou *Pseudomonas putida*. Ces enzymes sont particulièrement présentes en Asie du Sud-Est.

Elles se distinguent par leur habileté à inactiver la majorité des bêta-lactamines, particulièrement les carbapénèmes, dont l'imipenem, et offrent une résistance intrinsèque aux inhibiteurs de bêta-lactamases (**Livermore. 1995**).

### 2.2.2. Classification fonctionnelle (classification de Bush, Jacoby et Medeiros, 1995) :

Cette classification a initialement été décrite par **Jack et al** en 1970, pour ensuite être révisée à deux reprises par Bush (**Bush. 1989 ; Bush et al. 1995**). La version récente propose de classer ces enzymes en fonction de:

- 1) Substrat de préférence entre la pénicilline, oxacilline, carbénicilline, céphaloridine, céphalosporines à large spectre d'activités et imipenem.
- 2) profil d'inhibition au clavulanate. Cette classification phénotypiques font face au problème, que les différentes mutations ponctuelles peuvent, considérablement, changer la spécificité du substrat (**Philippon et al. 1989; Jacoby et Medeiros. 1991**) et leur inhibiteurs.
  - **Le groupe 1** correspond aux céphalosporinases appartenant à la classe C de Ambler.
  - **Le groupe 2** comprend les bêta-lactamases des classes A et D de Ambler.
  - **Le groupe 3** correspond à la classe B de Ambler.

## *Chapitre 2*

*Pseudomonas aeruginosa*

&

*Les métallobêta-lactamases*

## 1. *Pseudomonas aeruginosa*

### 1.1. Taxonomie, classification

Décrit par Schroeter, en 1872, puis par Gessard, en 1882, *Pseudomonas aeruginosa* (du latin *aerugo* : vert de gris), encore appelé bacille pyocyanique (du grec *puon* : pus et du latin *cyaneus* : bleu foncé) appartient à la famille des *Pseudomonadaceae*. Dans les années 1960, une première classification de cette famille a été proposée sur la base de critères phénotypiques (STANIER *ET AL.*, 1966). Puis, dans les années 1970-80, à partir des résultats d'hybridation ARNr-ADN, cette famille a été subdivisée en 5 grands groupes (PALLERONI *ET AL.*, 1973) dont le groupe I comprend le genre *Pseudomonas sensu stricto* qui compte à ce jour plus de 140 espèces. L'analyse phylogénique des séquences de l'ARN ribosomal 16S a ensuite permis la division de ce genre en 7 sous-groupes (ANZAI *ET AL.*, 2000) (figure 1). *P. aeruginosa* représente 80% des *Pseudomonas* isolés en Bactériologie médicale. C'est un bacille à Gram négatif à ciliature monotriche, aérobie strict, de métabolisme oxydatif et caractérisé par la production d'un pigment phénazinique : la pyocyanine. Son génome de 6,3 millions de bases (le plus grand des génomes bactériens séquencés à ce jour) présente un pourcentage en GC élevé (66,6%) (STOVER *ET AL.*, 2000).

### 1.2. Habitat

Selon Palleroni, N., [137] *Pseudomonas aeruginosa* est l'espèce bactérienne dont l'habitat est le plus vaste. Elle vit à l'état saprophyte dans l'eau et les sols humides (elle résiste mal à la dessiccation) ou à la surface des végétaux. Elle vit également à l'état commensal dans l'intestin de l'homme et des animaux. Elle est isolée rarement, de la peau et des muqueuses de l'homme et des animaux. De nombreuses souches pouvant se développer à basse température (souches psychrophiles) contaminent les denrées alimentaires ou produits pharmaceutiques conservés au réfrigérateur. Elle peut aussi contaminer le matériel hospitalier, hôtelier (robinetterie), médical (sondes, trocarts, cathéters) ou chirurgical (instruments, matériels de prothèse), les solutions antiseptiques, les solutés injectables, des produits médicamenteux ou cosmétiques.

### 1.3. Caractères bactériologiques

Les souches de cette espèce sont constituées de bacilles de 0,5 à 0,8  $\mu\text{m}$  de diamètre sur 1,5 à 3,0  $\mu\text{m}$  de longueur, se présentant de manière isolée ou groupée par deux ou

en courtes chaînes, mobiles grâce à une ciliature monotriche (quelques rares cellules portent cependant plusieurs flagelles polaires), produisant le plus souvent de la pyoverdine et de la pyocyanine (les souches ne produisant aucun de ces pigments sont très peu nombreuses), pouvant également excréter de la pyomélanine (pigment brun noir) et de la pyorubrine (pigment rouge), nitrate réductase positive et respirant les nitrates, catalase et oxydase positives, ADH positive, citrate de Simmons positive, hydrolysant la gélatine (gélatinase très active), donnant une réponse négative aux tests LDC, ODC, TDA, indole,  $\beta$ -galactosidase (mais quelques souches hydrolysent l'ONPG au moyen d'une enzyme différente de la  $\beta$ galactosidase), uréase, production d'hydrogène sulfuré, hydrolyse de l'amidon, hydrolyse de l'esculine et lécithinase.

*Pseudomonas aeruginosa* assimile de nombreux composés carbonés (acétamide, acétate, D-alanine, L-arginine, butyrate, géraniol, glucose, lactate, malonate, mannitol, propionate), mais elle n'utilise ni l'adonitol ni l'inositol ni le maltose ni le mucate ni le saccharose ni le sorbitol ni le tréhalose. La température optimale de croissance est comprise entre 30 et 37 °C, mais il peut pousser à 42 °C, mais aucune culture n'est obtenue à 4 °C ou à 46 °C.

Les colonies de *Pseudomonas aeruginosa* sont de trois types :

- Les colonies larges sont grandes, rugueuses avec un centre plus bombé (colonies en oeufs sur le plat) et un bord irrégulier. Très souvent, les colonies la présentent sous forme de petits phages d'autolyse donnant un reflet irisé ou métallique caractéristique.
- Les colonies *sm* (small) sont rondes, petites, convexes et lisses.
- Les colonies muqueuses sont bombées, opaques visqueuses, filantes, ou parfois coulantes. Elles possèdent une pseudo-capsule constituée d'alginate.

*Pseudomonas aeruginosa* possède de nombreux plasmides transférables par conjugaison ou par transduction et la plupart des souches (probablement 100% des souches). Sont lysogènes et souvent polylysogènes (une même souche peut héberger 8 à 10 phages tempérés sur son chromosome ou sur un plasmide). Cette haute fréquence de lysogénie n'est pas retrouvée pour les autres espèces du genre *Pseudomonas*.

## 2. Mécanisme de résistance aux $\beta$ -lactamines chez de *P. aeruginosa*

### 2.1. Résistance par production de $\beta$ -lactamases de classe B

Les métallo-bêta-lactamases, MBLs, correspondent à la classe B de la classification structurale d'Ambler et au groupe 3 de la classification fonctionnelle de Bush. Leur site actif contient un ou deux ions zinc, à la différence des autres bêta-lactamases dites à sérine active. Elles possèdent un spectre d'hydrolyse variable selon l'enzyme, qui peut inclure toutes les bêta-lactamines sauf les monobactames (aztréoname) (NORDMANN ET POIREL, 2002) et efficace de carbapénèmase. La propriété des métallo-bêta-lactamases est une caractéristique la plus inquiétante en microbiologie clinique parce que les carbapénèmes, qui sont stables vis-à-vis la grande majorité de sérine-bêta-lactamases produite par les agents pathogènes résistants, sont les antibiotiques avec le plus large spectre de l'activité. Les métallo-bêta-lactamases ne sont pas inactivées par les inhibiteurs classiques des bêta-lactamases, le premier de ces enzymes, le *Bacillus cereus* métallo-bêta-lactamase, a été identifié en 1966 où le Sabbat et l'Abraham ont prouvé que l'activité de cephalosporinase produite par un isolat de *B. cereus* a été empêchée par l'EDTA (ABRAHAM ET CHAIN, 1966). Pendant les deux décennies suivantes, il était le seul exemple connu de métallo-bêta-lactamase et a été simplement considéré comme curiosité biochimique. La situation a changé après 1980. En effet, bêta-lactamases de zinc ont été découverts dans un nombre croissant de souches nosocomiales telles que *Bacteroides fragilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila*, *Serratia marcescens*, *Elizabethkingia meningoseptica* (anciennement *Chryseobacterium meningosepticum*) et un gène codant pour un silencieux métallo-bêta-lactamase a été découvert dans *Bacillus anthracis*. Certaines MBL sont codées par des gènes naturellement présents sur le chromosome de certaines bactéries comme, *Bacillus* spp., *B. fragilis*, quelques espèces de *Aeromonas* et de flavobactéries. D'autres MBLs ont été acquises et identifiées dans des espèces comme les Enterobacteriaceae, *P. aeruginosa* et *A. baumannii*.

Ces carbapénèmases acquises constituent actuellement sept groupes décrits chez *P. aeruginosa*: IMP (active sur l'IMiPenem), VIM (Verona Integron-encoded Metallo-bêta-lactamase), SPM (Sao-Paulo Metallo-bêta-lactamase), AIM (Australia IMipenemase), GIM (German IMipenemase) et, plus récemment NDM-1 (New Delhi

Métallo-bêta-lactamase) et FIM-1 (Florence imipenemase). Les types IMP et VIM demeurent les MBLs les plus rapportées dans le bassin méditerranéen chez *P. aeruginosa* (CORNAGLIA ET AL., 2011).

## 2.2. Classification

Les bêta-lactamases de la classe B sont classifiées dans trois sous-classes B1, B2 et B3 (GALLEN ET AL., 2001). Cette division est basée sur la sélectivité de substrat et l'ordre d'acide aminé, en particulier les ligands d'acide aminé qui chélatent les ions de  $Zn^{2+}$  (LIENARDE ET AL., 2008).

### 2.2.1. Sous-classe B1:

Les enzymes de la sous-classe B1 partagent l'identité plus de 23%. Ces enzymes incluent la plupart des métallo-bêta-lactamases connues : métallo-bêta-lactamases provenant de *P. aeruginosa*, VIM, GIM et SPM-1. Le mécanisme catalytique des enzymes de cette sous-classe nécessitent deux ions zinc coordonnés à trois résidus histidines et un résidu cystéine (WALSH ET AL., 2005 ; GUPTA, 2008).

### 2.2.2. Les MBLs de type IMP

La première description d'une métallo-bêta-lactamase transférable a été la découverte d'une souche de *P. aeruginosa* productrice d'une enzyme de type IMP, au Japon, en 1988 (WATANABE ET AL., 1991). Le gène de résistance était porté par un plasmide conjugatif. Par la suite, il a été retrouvé chez 16 espèces bactériennes différentes, sur des intégrons de classe 3, essentiellement au Japon. De nombreux variants dérivant de l'enzyme IMP ont successivement été recensés en Asie, mais aussi sur les continents européen et américain, le rapport le plus récent concerne IMP-18 aux USA (TOLEMAN ET AL., 2005).

### 2.2.3. Les MBLs de type VIM

Le type VIM est le plus répandu dans le monde (CORNAGLIA ET AL., 2011). La carbapénèmase de type VIM-1 rapportée la première fois en Méditerranée chez une souche de *P. aeruginosa* nosocomiale isolée à l'hôpital universitaire de Vérone, en Italie, en 1997 (LAURETTI ET AL., 1999), a été le premier représentant de cette

nouvelle famille de MBLs acquise capable d'hydrolyser la plupart des  $\beta$ -lactamines sauf l'aztréonam. L'enzyme VIM-2 décrite la première fois chez un patient hospitalisé à Marseille en France. Les VIM sont des MBLs prédominantes dans la Méditerranée et ont été rapportés dans plusieurs pays du bassin méditerranéen (POIRELET *AL.*, 2000).

#### 2.2.4. Les MBLs de type SPM

En 2001, la bêta-lactamase SPMA a été caractérisée à Sao Paulo, au Brésil (TOLEMAN *ET AL.*, 2002). Elle est codée par un gène présent sur un fragment d'ADN de GC% différent de celui de *P. aeruginosa*, suggérant qu'il appartenait à l'origine à une bactérie d'un autre genre (TOLEMAN *ET AL.*, 2002).

#### 2.2.5. Les MBLs de type GIM

La classe de métallo-bêta-lactamases est celle de type GIM, identifiée en 2002, en Allemagne (CASTANHEIRA *ET AL.*, 2004).

#### 2.2.6. Les MBLs de type FIM-1

Une nouvelle MBL de type FIM-1 a été identifiée en 2007 en Italie (POLLINI *ET AL.*, 2013).

### 2.3. Sous-classe B2:

Les membres de la sous-classe B2 montrent seulement 11% de l'identité avec des membres de la sous-classe B1. Cette sous-classe inclut surtout les enzymes produites par différentes espèces de *Aeromonas* (ACSP, SIG, ACSP2, Cph A), (GARAUET *AL.*, 2005) et de *Serratia* (SFH-I) (GUPTA, 2008). Par comparaison aux enzymes de la sous-classe B1, les enzymes de cette sous-classe possèdent au niveau de leur site actif un résidu asparagine à la place de l'histidine (His116) (BEBRONE, 2007).

### 2.4. Sous-classe B3:

La sous-classe B3 a seulement neuf résidus conservés en comparaison avec l'autre métallo-bêta-lactamases. Les enzymes qui sont incluses à cette sous-classe, la (L1) et (GOB-1) métallo-bêta-lactamases produites par des souches de *Stenotrophomonas maltophilia* cliniques et *Elizabethkingia meningoseptica* (anciennement *Chryseobacterium meningosepticum*) (BELLAIS *ET AL.*, 2000),

*Legionellagormanii*(FEZ-1), *MarcescenSerratia*(SMB-1) (BOSCHI ET AL., 2000). A l'exception de L1 qui est un homo-tétramère, l'ensemble de ces enzymes sont des monomères comme les enzymes de B1 et B2 (ULLAH ET AL., 1998).

### 3. Les profils d'activité

Les enzymes appartenant aux sous-classes B1 et B3 possèdent un site actif contenant deux ions zinc et ont un spectre large. Ces enzymes hydrolysent la plupart des bêta-lactamines, y compris les carbapénèmes (FELICI ET AL., 1993), mais sont inactives sur les monobactames. Ces enzymes présentent par ailleurs la particularité de ne pas être inhibées par les inhibiteurs classiques des bêta-lactamases comme l'acide clavulanique et le tazobactam qui se comportent comme de mauvais substrats (PROSPERI-MEYS ET AL., 1999).

Les enzymes de la sous-classe B2 ont un site actif contenant un seul ion zinc et sont des carbapénémases(WALSH ET AL., 2005 ;SEGATORE ET AL., 1993) strictes qui n'hydrolysent efficacement que les carbapénèmes et qui ont une faible activité envers les pénicillines et les céphalosporines. Dans les enzymes B2 le His116 conservé des enzymes B1 et B3, est remplacé par une asparagine. La présence de cette asparagine en position 116 est loin d'être la seule raison qui explique l'éventail étroit de B2 métallo-bêta-lactamases.

## 4. Structure

### 4.1. Structure moléculaire commune

Les métallo-bêta-lactamases sont des hydrolases qui contiennent en moyenne 230 résidus d'acides aminés. Leurs poids moléculaires varient entre 25 et 118 KDa; leurs points Isoélectriques 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 (GONZALEZ ET AL., 2007). Celui-ci varie approximativement de 25% à 40% dans une même sous-classe et de 10% à 20% entre deux sous classes (GARAUET AL., 2005). 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**).

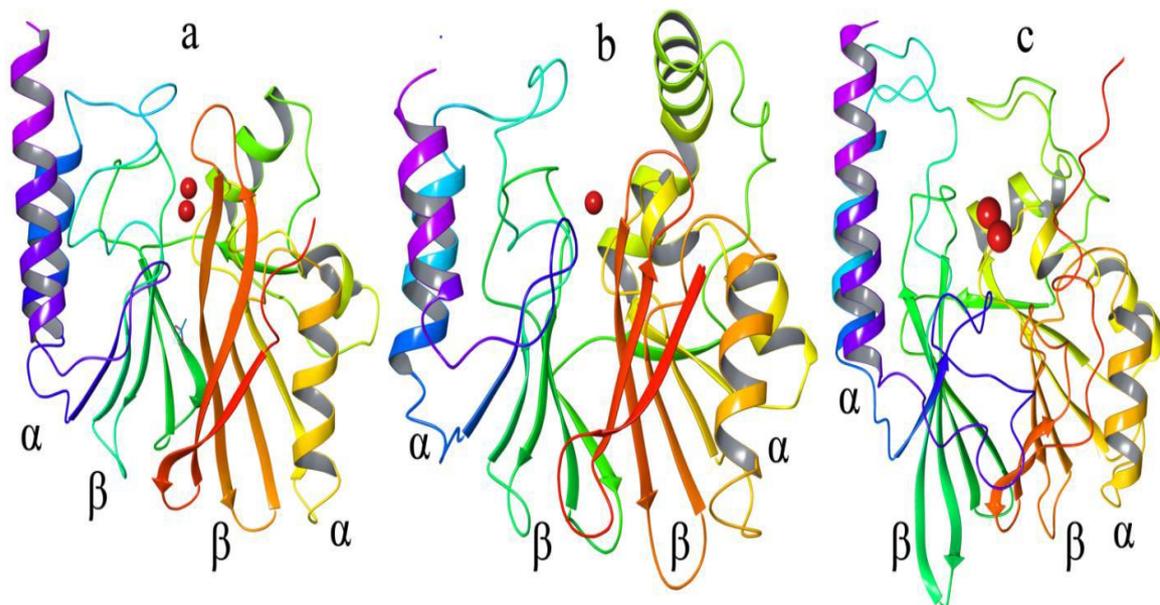
Les structures secondaires de toutes les MBLs comprennent des structures  $\alpha$  (hélices), des structures  $\beta$  (feuillet) et des boucles dont leurs nombres sont de 5, de 12 et de 1, dans l'ordre (**BABIC ET AL., 2006**).

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 feuillet  $\beta$  centraux et cinq hélices  $\alpha$  périphériques. Selon **ROSSOLINI ET DOCQUIER, 2007**, 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 de type  $\alpha\beta/\beta\alpha$  (**GONZALEZ ET AL., 2007**) qui est à titre indicatif complètement sans rapport avec celle des serine bêta-lactamases (**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  $\alpha\beta$  (**MAJIDUDDINET AL., 2002**). Toutes les structures de MBLs présentent un pli global similaire avec des feuillet 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 (**ROSSOLINI ET DOCQUIER, 2007; HU ET AL., 2008**).

#### 4.2. Différence de structure

Il existe des différences structurelles entre les enzymes des différentes sous-classes relatives à l'architecture moléculaire et à la structure du site actif. Les enzymes de la sous-classe B3 présentent une taille moléculaire supérieure à celles des autres sous-classes en raison de la grande taille de leur polypeptide (entre 25 et 30 kDa). Les résidus d'acides aminés supplémentaires sont essentiellement logés dans les feuillets  $\beta$ 10 et  $\beta$ 11 et l'hélice  $\alpha$ 5 du domaine C-terminal, dans la boucle qui joint les domaines N-terminal et C-terminal et la terminaison N (dans l'enzyme L1). Les enzymes de la sous-classe B2 diffèrent des membres des autres sous-classes par:

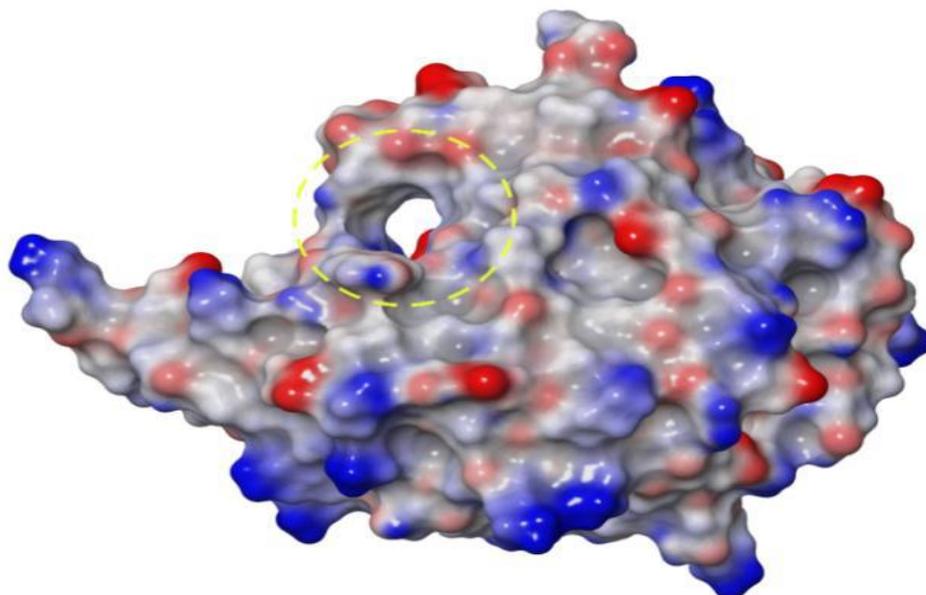
- La présence d'une hélice  $\alpha$ 3 allongée, qui est situé juste au-dessus de la poche du site actif ;
- L'absence de boucles mobiles (entre  $\beta$ 3 et  $\beta$ 4 dans les membres de la sous classe B1 ou entre  $\alpha$ 3 et  $\beta$ 7 dans ceux de la sous classe B3) à proximité du site actif (**ROSSOLINI ET DOCQUIER, 2007**).



**Figure 4 :** structures 3D représentant MBLs. Les  $\alpha$ -spiraes sont montrées en pourpre et jaune,  $\beta$ - feuillets en vert et rouge et ions de  $Zn^{2+}$  en tant que sphères rouges. (a) Sous-classe B1, IMP-1, (b) Sous-classe B2, CphA. (c) Sous-classe B3, L1. (**BEBRONE ET AL., 2007 ; HERZBERG ET FITZGERALD, 2006**)

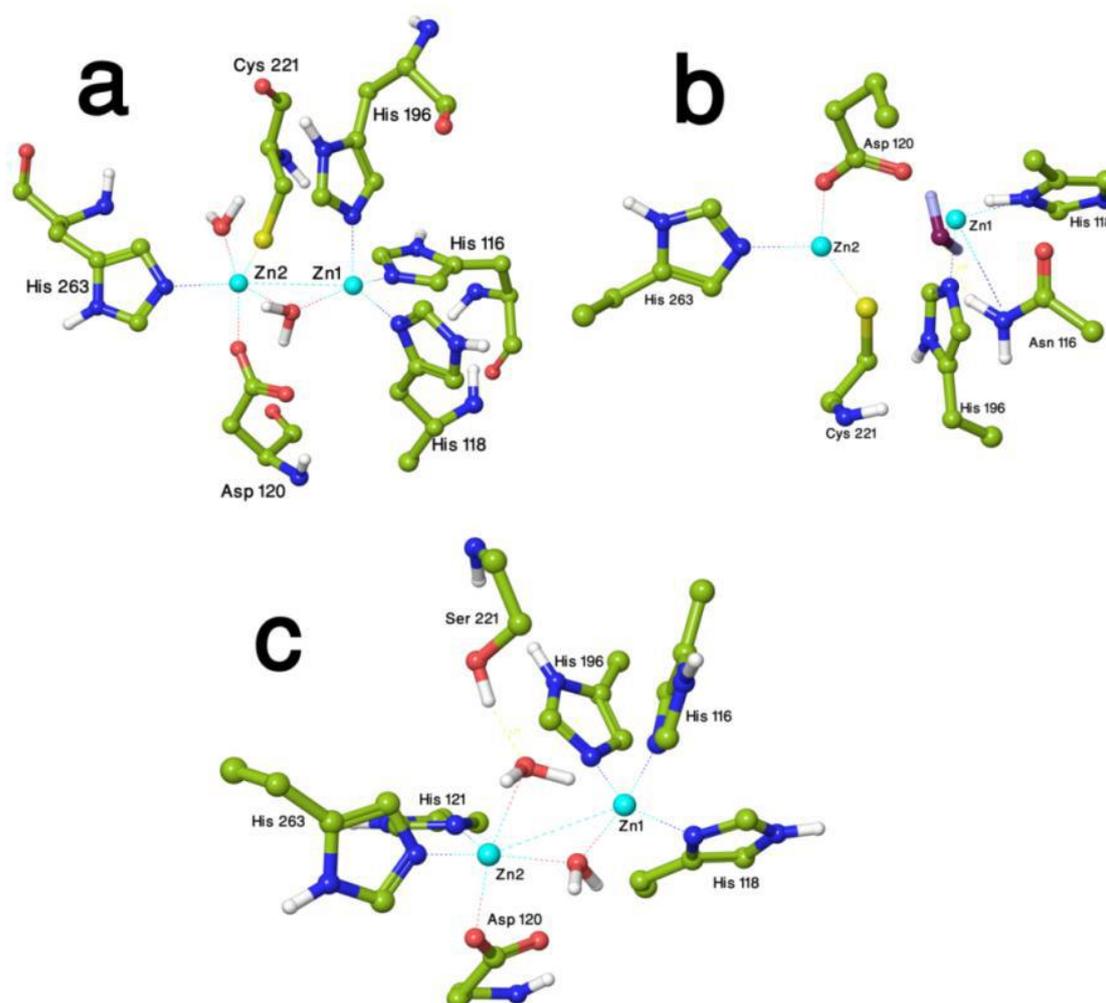
### 4.3. Structure du site actif

Les MBLs possèdent généralement un site actif constitué de résidus d'acides aminés coordonnés à un ou à deux ions zinc. Ces acides aminés sont fréquemment l'asparagine, la cystéine et trois à cinq histidines.



**Figure 5** : Représentant typique de poche du site actif de la MBL (IMP-1). Figure a été créé avec le logiciel Maestro ([www.schrodinger.com/Maestro](http://www.schrodinger.com/Maestro)). (WALTER ET SUTTON, 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 (GUPTA, 2008). Dans le cas du site mononucléaire, les acides aminés établissant des liaisons avec le seul ion zinc sont trois résidus histidines (Fig.6). Dans le cas du site bi-nucléaire, l'un des ions de zinc est coordonné par trois histidines (His116, His118 et His196) et une molécule d'eau avec l'arrangement de l'ion de zinc étant tétraédrique. Le second ion zinc est coordonné par le groupe carboxylate d'Asp120, le groupe de méthyl thiolate de Cys221, l'atome d'azote du groupe imidazole de His263 et deux molécules d'eau. La géométrie de ce complexe est déformée pentagonale (BEBRONE, 2007 ; HERZBERG ET FITZGERALD, 2006).



**Figure 6 :** Structure représentative du site actif dans MBL. (a) Sous-classe B1, IMP-1. (b) Sous-classe B2, CphA. (c) Sous-classe B3, L1. (**BEBRONE, 2007 ; HERZBERG ET FITZGERALD, 2006**).

Dans la classe B2, le site actif est toujours du type mononucléaire. Les acides aminés établissant des liaisons avec le seul ion de zinc sont des résidus d'asparagine, de cystéine et d'histidine (**PAGE ET BADARAU, 2008**).

En fin, dans la classe B3, le site actif peut être mono ou bi-nucléaire. Dans le cas du site mononucléaire, 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 histidines (**BOUNAGA, 1998 ; ROSSOLINI ET DCOQUIER, 2007**); avec le deuxième ion zinc a

changé de Cys221 en His121. Un changement associé est que le Cys221 a été substitué à Ser221 qui s'engage maintenant dans une interaction de liaison hydrogène avec l'eau liée de zinc (**Tab.2**).

**Tableau 2** : Les résidus d'acides aminés du site actif des trois sous-classes MBLs coordonnés avec les ions du zinc (**GALLENIE ET AL., 2001**).

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

\*BBL : Bêta-lactamase classe B

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 3H 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**).

## 5. Mécanisme d'action

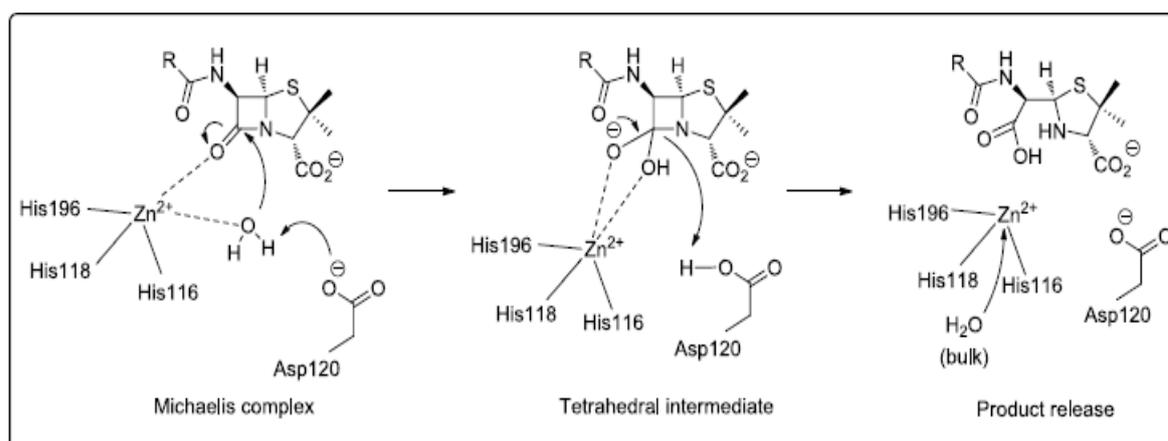
Comme mentionné ci-dessus, Les MBLs utilisent au moins un, mais les plus souvent deux ions  $Zn^{2+}$  dans leur site actif pour catalyser l'hydrolyse des cycles bêta-lactame. Deux mécanismes sont proposés pour la MBL à base d'ions mono-zinc et de di-zinc (**PAGE ET BADARAU, 2008**). Dans ce qui suit nous nous limiterons au mécanisme catalytique proposé par Abriata et ses collaborateurs (2008) dans le cas d'une MBL de

classe B1 (BCII), une MBL d'un site actif qui peut être mono ou di-zinc (**BREECEET AL., 2012**).

### 5.1. Cas du site actif mono-nucléaire :

Les principales étapes du mécanisme catalytique sont :

- (i) la formation du complexe de Michaëlis: le OH de l'eau déprotoné par le résidu asparagine 120, établie une liaison avec l'ion Zn et attaque le carbone du carbonyle du cycle beta-lactame. Ceci entraîne la formation d'un complexe intermédiaire tétraédrique chargé négativement. Les quatre liaisons établies par l'ion zinc servent de stabilisateur de cet intermédiaire.
- (ii) la catalyse: le résidu Asp120 fait don d'un proton à l'azote du cycle  $\beta$ -lactame entraînant le clivage de la liaison C-N de ce cycle et son ouverture.
- (iii) libération du produit : le clivage de liaison C-N du cycle beta-lactame ionise le carbone du carbonyle du même cycle lui permettant d'établir une double liaison avec l'oxygène chargé du complexe intermédiaire formé à la suite de la première étape. Ceci est soldé par la libération du produit et du site actif de l'enzyme (**DE SENYET AL., 2002**)



**Figure 7** : Mécanisme d'hydrolyse des beta-lactames par une MBL de la sous-classe B1 (BCII mononucléaire) proposé par Karsisiotis et ses collaborateurs. (1): mécanisme de formation du complexe de Michaelis, (2): mécanisme de clivage de la liaison C-N du cycle bêta-lactames (ouverture du cycle), (3): dissociation du complexe produit-enzyme (**KARSISIOTIS ET AL., 2014**).



## 6. Inhibiteurs

Une stratégie potentielle pour surmonter les effets de MBLs est de co-administrer des inhibiteurs de MBL avec des antibiotiques de bêta-lactamines. Les inhibiteurs empêchent lier de l'enzyme de MBL aux antibiotiques de bêta-lactamines et empêchent la dégradation et la désactivation des antibiotiques. Bien qu'il existe des inhibiteurs cliniquement disponibles pour sérine-bêta-lactamase, il n'y a aucun inhibiteur médicalement disponible pour les MBLs (SIMMET *AL.*, 2005; KIMET *AL.*, 2011 ; VELLA *ET AL.*, 2011 ; ZHU *ET AL.*, 2013). En plus, les métallo-bêta-lactamases ne sont pas inhibées par les inhibiteurs classiques de serine-bêta-lactamases: l'acide clavulanique, le tazobactam et le sulbactam (CHAKRABORTY *ET AL.*, 2012 ; DRAWZ *ET BONOMO*, 2010).

Une autre difficulté est de trouver un composé actif sur toutes les trois sous-classes de métallo-bêta-lactamases et même sur toutes les enzymes dans une même sous-classe. Actuellement, les inhibiteurs connus inhibent efficacement un ou deux métallo-bêta-lactamases et sont beaucoup moins en actif contre les autres. De plus, ils restent peu pratiques à utiliser comme agents thérapeutiques. En 2004, Toney et Moloughney revue de la littérature sur les inhibiteurs de MBL (TONEY *ET MOLOUGHNEY*, 2004), et plus récemment Walsh Consacré un paragraphe sur les inhibiteurs expérimentaux dans leur revue sur MBLs transmissible (WALSH *ET AL.*, 2005).

Ces inhibiteurs peuvent être:

- (i) des composés qui modifient l'enzyme de façon covalente irréversible; à titre d'exemple, il s'agit de p-chloromercuribenzoate (BUSH, 1989), de l'acide iodoacétique (PAYNE, 1993), de l'acide thioglycolique (PAYNE *ET AL.*, 1997).
- (ii) des composés qui chélatent le zinc coordonné au site actif, ce qui entraîne l'inactivation réversible de l'enzyme, tels que l'EDTA, le 1, 10-phénanthroline, l'acide dipicolinique, deux phénazines de *Streptomyces* sp, le bis (1N-tétrazol-5-yl) amine (TONEY *ET AL.*, 1999) et l'EGTA (LARAKI *ET AL.*, 1999).
- (iii) des composés qui inhibent de façon compétitive la liaison du substrat, soit par imitation de la structure du substrat  $\beta$ -lactame soit par coordination avec l'ion zinc coordonné au site actif (SIMMET

*AL.*, 2005). Ces derniers composés comprennent les tétrazolesbiphényles (**TONEYET *AL.*, 1998**), les dérivés de l'acide mercaptophényl acétique (**PAYNE, 1993**), de l'acide thiomandelique (**MOLLARD ET *AL.*, 2001**; **KARSISIOTIET *AL.*, 2013**) et les dérivés thioxo-céphalosporines (**TSANG ET *AL.*, 2004** ; **FARIDON ET ISLAM, 2013**).

## *Chapitre 3*

### *Plante étudiée*

## 1. L'olivier

### 1.1. Classe botanique

L'olivier est un arbre cultivé pour son fruit, l'olive, qui donne une huile recherchée « l'huile d'olive ». Cette dernière, mais aussi les olives de table, sont des éléments importants de la diète méditerranéenne et sont consommées en grande quantité dans le monde entier. La classification botanique de l'arbre de l'olivier selon (CRONQUIST, 1981) est la suivante :

Règne: Plantae

Sous-règne : Tracheobionta

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Sous-classe : Asteridae

Ordre : Scrophulariales

Famille : Oleaceae

Genre : Olea

Espèce: europaea

Sous-espèce: europaea



Figure 9 : Olivier

### 1.2. Distribution géographique

Pour les botanistes, l'aire de répartition de l'olivier est synonyme de "région méditerranéenne". L'olivier (*Olea europaea*) est cultivé depuis très longtemps autour de la méditerranée et de la mer noire surtout en : Espagne, Italie, Grèce, Turquie, France, Tunisie, Algérie et Croatie (figure19). Aujourd'hui si l'on trouve des plantations en Californie, Australie, Afrique du Sud. Cette répartition géographique est influencée par des facteurs climatiques et pédologiques. (Gaussorgues, 2009 ; Carrion, *et al.*, 2010).



Figure 10 : Zones de répartition géographique de la culture de l'olivier dans le bassin Méditerranéen (GHEDIRA, 2008)

## 2. Les feuilles d'olivier

### 2.1. Historique d'utilisation des feuilles en médecine traditionnelle

L'olivier est cultivé depuis au moins 3 500 ans avant notre ère, pour ses fruits et pour l'huile qu'on en tire. Le nom scientifique de l'arbre, *Olea*, vient d'un mot qui signifiait « huile » chez les Grecs de l'Antiquité. À cette époque, les feuilles sont employées pour désinfecter les blessures cutanées. (Caturla, 2005)

Les Anciens leur attribuaient des vertus antiseptiques et la propriété de combattre toutes sortes d'infections. Au XIXe siècle, elles servaient pour combattre le paludisme (malaria). Ces usages sont tombés en désuétude pendant un certain temps en raison de l'omniprésence des antibiotiques. Cependant, depuis quelques années, des suppléments de feuille d'olivier se trouvent sur le marché. Les fabricants de ces produits en vantent les vertus pour le système immunitaire et contre les infections virales, bactériennes et fongiques (MICOL ET AL., 2005).

### 2.2. Composition des feuilles d'olivier

Les feuilles fraîches d'olivier sont caractérisées par une matière sèche aux alentours de 50%. Le Tableau 3 montre sa composition chimique globale selon différents auteurs. La composition chimique des feuilles varie en fonction de nombreux facteurs : variété, conditions climatiques, époque de prélèvement, âge des plantations (NEFZAOU, 1995). Les feuilles sont particulièrement riches en carbohydrates. La matière organique est constituée par des protéines, des lipides, des monomères et polymères phénoliques (tel que les tannins) et principalement par des polysaccharides (tel que cellulose, hémicelluloses). (ERBAY ET ICIER, 2009).

La teneur en protéine est faible dans les feuilles d'olivier. Le Tableau 4 présente sa composition en acides aminées, qui est particulièrement diversifié.

**Tableau 3 :** Composition chimique globale des feuilles d'olivier (exprimé en g par 100 g) selon plusieurs auteurs.

Composition (en %)	Boudhriou a et al., 2009	Erbay et Icier, 2009	Martin-Garcia et al., 2006	Garcia-Gomez et al., 2003	Fegeros et al., 1995
Eau	46,2-49,7 a	49,8 a	41,4 a	nd	44,0 a
Protéines	5,0-7,6 a	5,4 a	7,0 b	nd	nd
Lipides	1,0-1,3 a	6,5 a	3,2 b	6,2 b	nd
Minéraux	2,8-4,4 a	3,6 a	16,2 b	26,6 b	9,2 b
Carbohydrates	37,1-42,5 a	27,5 a	nd	nd	nd
Fibres brutes	Nd	7,0 a	nd	nd	18,0 b
Cellulose	Nd	nd	nd	19,3 b	11,4 b
Hémicellulose	Nd	nd	nd	25,4 b	13,3 b
Lignin	Nd	nd	nd	30,4 b	14,2 b
Polyphénols totaux	1,3-2,3 b	nd	2,5 b	nd	nd
Tannins solubles	Nd	nd	nd	nd	0,3 b
Tannins condensés	Nd	nd	0,8 b	nd	1,0 b

a : correspond aux valeurs exprimées par rapport à la masse fraîche des feuilles d'olivier.  
 b : correspond aux valeurs exprimées par rapport à la masse sèche des feuilles d'olivier.  
 nd : valeur non déterminée

**Tableau 4 :** Composition en acides aminés des feuilles d'olivier fraîche (exprimé en g par Kg d'azote total) selon (MARTIN-GARCIA ET MOLINA-ALCOIDE, 2008)

Acides aminés	Concentration
Acide aspartique	27,5
Acide glutamique	35,1
Serine	44,5
Glycine	79,6
Histyline	25,4
Arginine	162,0
Threonine	46,8
Alanine	73,8
Proline	84,2
Tyrosine	32,3
Valine	74,8
Mehionine	5,3
Cysteine	1,6
Isoleucine	58,8
Leucine	73,8
Phenylalanine	51,8
Lysine	19,1
Acides aminés essentiels	547
Acides aminés non essentiels	379
Acides aminés totaux (sans tryptophane)	926

**Tableau 5 :** Composition en minéraux des feuilles d'olivier (exprimé en g par Kg de matière sèche) selon (FEGEROS *ET AL.*, 1995)

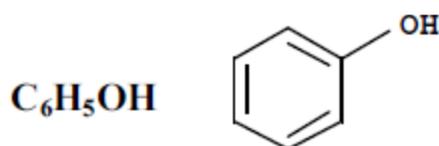
Minéraux	Concentration
Calcium (Ca)	12,7
Phosphore (P)	2,1
Manganèse (Mg)	1,9
Potassium (K)	6,3
Fer (Fe)	273,0
Cuivre (Cu)	10,7
Zinc (Zn)	21,3
Magnésium (Mn)	50,0

### 3. Les composés phénoliques des feuilles d'olivier

#### 3.1. Définition et localisation des composés phénoliques

Les composés phénoliques, métabolites secondaires, forment le groupe des composés organiques phytochimiques le plus important dans le royaume des végétaux avec plus de 8000 Structures phénoliques présents dans tous les organes de la plante (BETA *ET AL.*, 2005).

L'élément structural de base est un noyau benzoïque auquel sont directement liés un ou plusieurs groupes hydroxyles, libres ou engagés dans une autre fonction chimique (éther, méthylique, ester, sucre...) (BRUNETON, 1993).



**Figure 11 :** Formules brute et chimique d'une fonction phénol

Cette définition chimique n'est cependant pas tout à fait satisfaisante car elle inclut d'autres composés dont certaines hormones. Une définition métabolique lui est parfois préférée. Les composés phénoliques des plantes sont alors décrits comme les substances dérivées de la voie métabolique de l'acide shikimique (ROBARDS *ET AL.*, 1999; SANONER, 2001). Le terme de polyphénols est souvent consacré par l'usage pour désigner les composés phénoliques.

Dans la cellule, les composés phénoliques sont essentiellement localisés sous forme soluble dans les vacuoles. Ils peuvent également s'accumuler dans les parois végétales : c'est le cas de la lignine (hétéropolymère d'alcools coniférylique, p-coumarylique et sinapylique) ou de certains flavonoïdes (ROBARDS *ET AL.*, 1999; MACHEIX *ET AL.*, 2003).

### 3.2. Classification des composés phénoliques

Les composés phénoliques des plantes sont répartis en différentes classes selon la structure de leur squelette de base.

(**HARBORNE ET SIMMONDS, 1964**) ont classifié les composés phénoliques en groupes en se basant sur le nombre du carbone dans la molécule (Tableau 6).

**Tableau 6 :** Classification des composés phénoliques (selon **HARBORNE ET SIMMONDS, 1964**)

Structure	Classe
C6	Phenols simples
C6-C1	Acides phénoliques
C6-C2	Acétophénones et acides phenylacetiques
C6-C3	Acides cinnamiques, aldehydes cinnamyl, alcools cinnamyl, coumarins, isocoumarins et chromones
C15	Chalcones, auronnes, dihydrochalcones, flavans, flavones, flavanones, flavanonols, anthocyanidins, anthocyanins,
C30	Biflavonyls
C6-C1-C6, C6-C2-C6	Benzophenone, xanthonnes stilbenes
C6, C10, C14	Quinones
C18	Betacyanins
Lignans, neolignans	Dimers ou oligomeres
Lignin	Polymers
Tannins	Oligomeres ou polymers
Phlobaphenes	Polymers

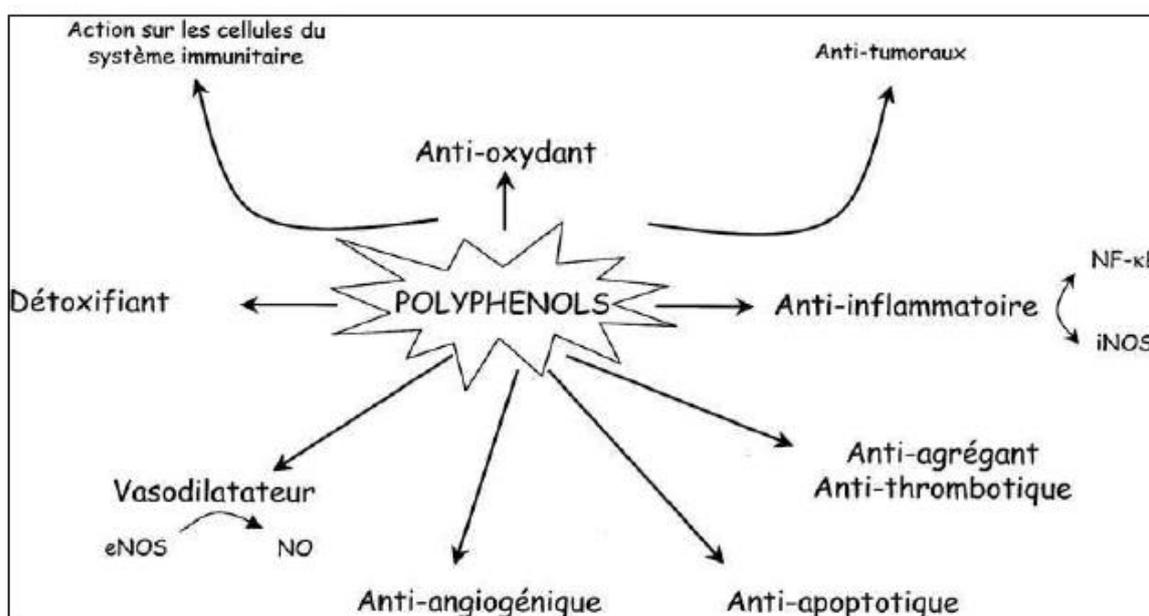
### 3.3. Activités biologiques des composés phénoliques

Les composés phénoliques sont connus par leurs rôles physiologiques très importants aussi bien dans le règne végétal qu'animal. En raison de leur structure, les composés phénoliques sont capables de se fixer sur certaines enzymes et protéines, et de modifier ainsi les équilibres enzymatiques : ils joueraient un rôle dans les chaînes d'oxydo-réduction et modifieraient certaines réactions concernant la croissance, la respiration et la morphogénèse. (**Malik et Bradford, 2006**).

Dans le règne végétal, ces substances sont souvent impliquées dans les mécanismes de défenses élaborés par les végétaux contre la prédation par des insectes, des herbivores et contre les infections et les agressions microbiennes multiples (**LO SCALZO ET AL., 1994 ; UCCELLA, 2001**). Outre, les composés phénoliques seraient associés à de nombreux processus

physiologiques : croissance cellulaire, différenciation, dormance des bourgeons, floraison, tubérisation (MALIK ET BRADFORD, 2006). Les composés phénoliques sont aussi responsable des propriétés sensoriels des plantes tel que la couleur, le goût et parfois l'odeur (OZKAYA ET CELIK, 1999).

En phytothérapie, l'effet de nombreuses plantes médicinales est attribué en tout ou partie aux composés phénoliques dans ces plantes. Ces substances possèdent des activités biologiques qui les rendent bénéfiques à la santé humaine (Fig. 12). Beaucoup d'études indiquent que les polyphénols pourraient diminuer le risque de survenue d'un certain nombre de pathologies, en particulier celles liées au vieillissement et aux lésions oxydatives (cancers, maladies cardiovasculaires ou neurodégénératives) (LEONG ET SHUI, 2002).



**Figure 12 :** Effets biologiques des polyphénols (MARTIN ET ANDRIANTSITOHAINA, 2002).

Les activités biologiques relatives à ce type de composés sont relativement diversifiées. Chaque classe chimique de polyphénols semble être utilisée pour ses vertus spécifiques (MARTIN ET ANDRIANTSITOHAINA, 2002). Les composés phénoliques sont principalement reconnus pour leur activité antimicrobienne et antioxydante, cette dernière est d'un intérêt général avec les récentes découvertes sur la prévention des cancers (KARAKAYA, 2004). Certains d'entre eux, tel que les coumarines, possèdent des propriétés antiinflammatoires (FYLAKTAKIDOU ET AL., 2004). D'autres, tel que les lignanes, possèdent des propriétés cytostatiques (HABTEMARIAM, 2003). Les flavonoïdes, une vaste famille de composés

phénoliques, protègent les tissus végétaux contre les rayons UV. La principale activité leur étant attribuée est une propriété « Vitaminique P » : ils diminuent la perméabilité des capillaires sanguins et les rendent plus résistants. Certains possèdent également des propriétés anti-inflammatoires, anti-allergiques, hépatoprotecteurs, antispasmodiques, hypocholestérolémiantes, diurétiques, antibactériens, antiviraux et parfois cytostatiques. Ils agissent aussi parfois comme piègeurs de radicaux libres et comme inhibiteurs enzymatiques. Les composés des autres familles de ce groupe (anthocyanosides, tannins et polyacétates) présentent fréquemment des propriétés thérapeutiques similaires à celles des flavonoïdes et des composés phénoliques en général (BRUNETON, 1993).

### 3.4. Composition des feuilles d'olivier en composés phénoliques

La teneur en composés phénoliques dans les feuilles d'olivier varie entre 2,8 mg/g de matière sèche et 44,3 mg/g de matière sèche. Elle peut même dépasser les 250 mg/g de matière sèche (MYLONAKI *ET AL.*, 2008).

La variation de la concentration des composés phénoliques dans les feuilles d'olivier, citée dans la littérature, dépend de la variété de l'olivier, des conditions climatiques, de l'époque de prélèvement des échantillons des feuilles, de l'âge des plantations et des échantillons des feuilles. En plus de ces facteurs de variabilité, il s'ajoute l'effet de la méthode de préparation des feuilles d'olivier (déshydratation et broyage), du procédé et des techniques d'analyses qualitative et quantitative des composés phénoliques. (BOUDHRIOUA *ET AL.*, 2009)

Les composés phénoliques dans les feuilles d'olivier sont très divers et leurs structures sont très variables. Les feuilles d'olivier contiennent des monomères et des polymères phénoliques. La composition phénolique des feuilles d'olivier a fait l'objet de nombreuses études. Une bibliographie des composés phénoliques identifiés est présentée dans le (Tableau 7) (ALTIOK *ET AL.*, 2008).

**Tableau 7** : Données qualitatives et quantitatives des principaux composés phénoliques identifiés dans un extrait des feuilles d'olivier selon (BENAVENTE-GARCIA ET AL., 2000).

Composés phénoliques	Temps de rétention (min) en HPLC	Pourcentage d'abondance dans un extrait (%)	Activité Antioxydante TEAC (mM)
Hydroxytyrosol	4,80	1,46	1,57
Tyrosol	5,83	0,71	0,35
Catéchine	8,41	0,04	2,28
Acide caféique	11,56	0,34	1,37
Acide vanillique	14,17	0,63	0,67
Vanilline	14,79	0,05	0,13
Rutine	17,22	0,05	2,75
Luteolin-7-glucoside	18,10	1,38	0,71
Verbascoside	20,06	1,11	1,02
Apigenin-7-glucoside	21,28	1,37	0,42
Diosmetin-7-glucoside	21,95	0,54	0,64
Oleuropéine	22,76	24,54	0,88
Lutéoline	28,61	0,21	1,42
Diosmetin	31,59	0,05	2,25
<b>Extrait de feuille</b>			<b>1,58</b>

### 3.5. Intérêts des feuilles d'olivier pour la santé humaine

Depuis l'antiquité, les feuilles d'olivier sont employées en phytothérapie. A l'époque Grecque, les feuilles ont été utilisées pour désinfecter les blessures cutanées. Les anciens leur attribuaient des vertus antiseptiques et la propriété de combattre toutes sortes d'infections. Au XIXème siècle, on s'en servait pour combattre le paludisme (malaria). Ces usages sont tombés en désuétude pendant un certain temps en raison de l'omniprésence des antibiotiques. Cependant, les professionnels modernes de la santé ont commencé à utiliser l'extrait de feuille d'olivier, en 1995, les premiers résultats furent très positifs. Depuis, il a été démontré que la feuille d'olivier possède de nombreux avantages thérapeutiques contre de nombreuses maladies et des vertus dans le maintien de la santé globale (AYDOGAN., 2008).

Par leurs pouvoir antimicrobien et antiviral, les feuilles d'olivier peuvent être bénéfique dans le traitement des affections causées par ou associés à un virus, un rétrovirus, une bactérie ou un protozoaire. Parmi ces pathologies traitables il y a: la grippe, le rhume, les infections dues aux candidas, la méningite, l'encéphalite, le VIH / SIDA, la fatigue chronique, l'hépatite B, la pneumonie, la tuberculose, la malaria, la diarrhée sévère, les infections des voies urinaire et les soins dentaires (CHERIF, 1996).



**Action antimicrobienne**

Un grand nombre de recherches confirment l'activité antimicrobienne de l'oleuropeine. Il est actif in vitro contre un grand nombre de germes (staphylococcus, streptococcus, hemophilus, pseudomonas...).Egalement actif dans certaines affections virales.il joue aussi un rôle dans la régulation de la flore gastrique par la réduction sélective de Helicobacter Pylori (**SUJANA ET AL, 2009**).Selon **FURNERI ET AL. (2002)** cette substance possède une forte activité antimicrobienne contre les bactéries gram négatives, gram positives et les mycoplasmes.

L'oleuropeine et les produits de son hydrolyse sont capables d'inhiber le developpent et la production de l'enterotoxine B par *Staphylococcus aureus*, le développement de *Salmonella enteritidis*, la germination et le développement des spores de *Bacillus cereus* (**BISIGNANO ET AL. 1999**). Il inhibe également le développement de *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* et *B. cereus* (**AZIZ ET AL., 1998**).

*Deuxième partie*

*Expérimentation*

# *Matériel et méthodes*

Le travail a été effectué, dans Laboratoire de Biotoxicologie, Pharmacognosie et Valorisation Biologiques des Plantes (LBPVBP). Université de SAÏDA

**L'objectif de cette étude :** était d'évaluer de trouver des composés présents dans l'extrait phénolique de (*Olea europaea*), qui ont des propriétés chélatrices ensuite de mettre en évidence, s'il y a lieu, l'effet inhibiteur de ce extrait sur des metallo-bêta-lactamases isolées d'une souche bactérienne de *Pseudomonas aeruginosa*

## **1. Matériel**

### **1.1. Matériel végétal**

Les travaux ont été effectués sur des échantillons de feuilles d'olivier de plusieurs variétés algériennes et d'une variété française au niveau de la commune de Youb (wilaya de Saïda) juste à la période de la récolte (octobre 2015). La collecte des feuilles était effectuée le matin.

### **1.2. Souches étudiées :**

Ces souches ont été incluses dans l'étude de souche de *Pseudomonas aeruginosa* isolées à partir de divers prélèvements au niveau d'hôpital de Mascara (matériels chirurgicale, les lits des malades) et identifiées au niveau de laboratoire de Biotoxicologie, Pharmacognosie et Valorisation Biologiques des Plantes (LBPVBP).  
Université de SAÏDA Méthodes

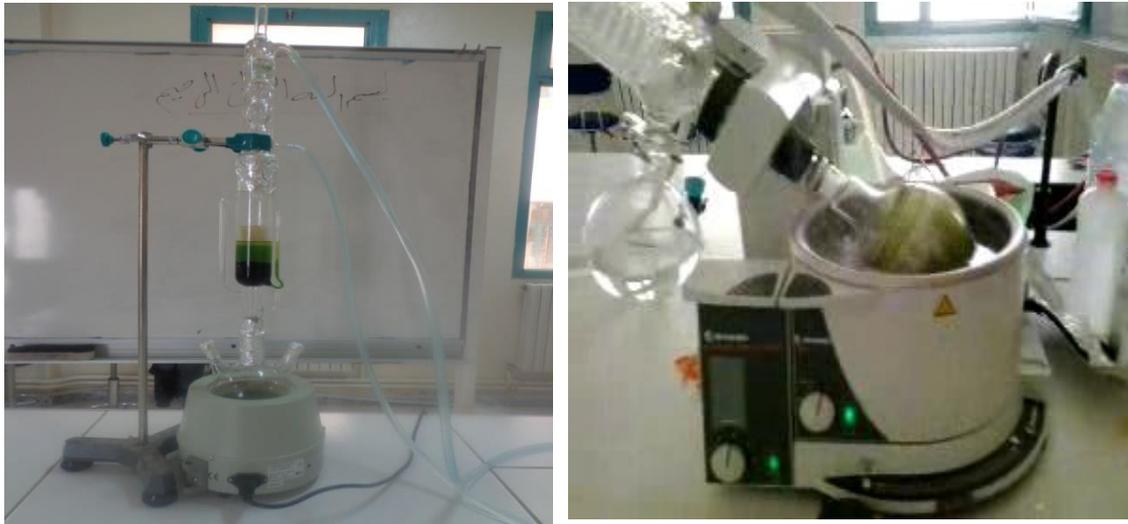
### **1.3. Préparation de l'extrait**

Les feuilles 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 à l'aide d'un mortier, puis extraite sous reflux en utilisant plusieurs solvants selon le protocole suivant :

### **1.4. Préparation d'extrait d'éthanol de 80%**

L'extrait des feuilles d'olive est extrait par un système Soxhlet (figure 14) à l'aide d'éthanol à 80%. Pour 25g de poudre de feuilles d'olive introduite dans une cartouche de cellulose, on a besoin de 250 ml d'éthanol à 80% pendant 3 h, et l'extraction a été répétée trois fois. Les extraits ont été filtrés à travers un papier filtre Whatman, on

récupère le solvant organique par une évaporation sous vide, porté à une température voisine de celle de l'ébullition du solvant, soit 60 °C environ (figure). Les résidus obtenus sont récupérés par diméthylsulfoxyde (DMSO) et conservés à 4° C.



**Figure 14** : Extraction des feuilles d'olive par Soxhlet (A gauche) et Evaporation sous vide par rotavapor de type Heidolph (A droite).

## 2. Prélèvement, isolement, et identification

### 2.1. Prélèvement

Les prélèvements ont été effectués, à partir de l'environnement (bord du lit, toilette et lavabo) et dispositifs médicaux (sondes urinaires, matériel chirurgical) par écouvillonnage et à partir de divers sites sur patient hospitalisés (aspiration trachéal, rectal, sonde vésicale, plaie et pus) au niveau des services (infections urinaires, les maladies infectieuses) puis acheminés au laboratoire dans des tubes de bouillon nutritif pour être incubés à 37°C pendant 24 heures.

### 2.2. Isolement et purification

L'ensemencement des souches a été réalisé sur le milieu Mac Conkey et incubé à 37°C pendant 24 heures. La purification des colonies bactériennes est précédée par repiquage successif sur le même milieu. L'isolement des souches de *Pseudomonas aeruginosa* est réalisé sur gélose nutritive additionnée au cétrimide.

### 2.3. Identification

L'identification préliminaire des espèces de *Pseudomonas* produisant le pigment fluorescent, est basée sur leurs caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques (Coloration de Gram, catalase, phénylène-diamine-oxydase, test de Voges -Proskauer et de rouge de Méthyle, utilisation du citrate, la formation d'indole, formation du dihydroxyacetone, déamination du phénylalanine, hydrolyse de caséine, dégradation de tyrosine, hydrolyse de gélatine, jaune d'œuf lécithines).

#### 2.3.1. Productions des pigments

Des espèces 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.

Le milieu estensemencé 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.

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

#### 2.3.2. Examen microscopique

Certaines 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.

##### ➤ 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.

➤ **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.

**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

**2.3.3. Test biochimiques**

➤ **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.



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.

➤ **Recherche de l'oxydase**

Les *Pseudomonas* sont aérobies stricts, elles se développent en présence d'oxygène sur des surfaces de gélose. Le caractère oxydase positif signifie que la souche possède de la hénylène-diamine-oxydase ou le cytochrome oxydase; enzyme entrant dans divers couples d'oxydoréduction.

À l'aide d'une pipette pasteur prendre d'une goutte de la suspension bactérienne et la déposer sur le disque d'oxydase.

➤ **Mannitol-mobilité**

Le test permettant de rechercher simultanément la fermentation du mannitol et l'étude de la mobilité de la souche. L'ensemencement du milieu s'est fait par piqûre centrale dans le culot jusqu'au fond du tube .Incubation dure 24 heures à 37C°.

La fermentation du mannitol se révèle par une acidification du milieu qui fait virer l'indicateur de pH au jaune.

La mobilité se traduit par la diffusion des bactéries à partir de la ligne d'ensemencement vers la périphérie, en créant une turbidité .Les bactéries immobiles poussent uniquement le long de la piqure centrale.

➤ **Citrate de Simmons**

Le milieu utilisé est le citrate de Simmons, qui ne contient que le citrate comme seule source de carbone et contient un indicateur de pH qui est le bleu de bromothymol, ce qui confère au milieu une coloration verte à l'état acide. Seules les bactéries possédant une enzyme citrate perméase seront donc capables de se développer sur ce milieu entraînent une alcalinisation du milieu, d'où le virage du vert au bleu.

➤ **Utilisation des sucres TSI (gélose au glucose, lactose, saccharose)**

Cette méthode permet de mettre en évidence d'une part, la fermentation du glucose (avec ou sans dégagement de gaz), du lactose, du saccharose et d'autre part, la production d'hydrogène de sulfate (H<sub>2</sub>S). C'est un milieu incliné dont le glucose présent dans le culot et la présence de lactose et le saccharose Sur la pente,.

L'ensemencement est réalisé par piqûre centrale dans le culot puis par stries sur la pente, la lecture se fait après 24 heures d'incubation à 37°C.

**Lecture :**

- Fermentation du glucose seulement : culot jaune et pente rouge.
- Fermentation du glucose et un des deux autres sucres (lactose ou sucrose) culot et pente jaune.
- Aucun sucre dégradé : pente rouge et culote rouge ou orange.
- Production de gaz : bulle (s) de gaz, milieu complètement séparé ou soulevé.
- Production de H<sub>2</sub>S : précipité noirâtre plus ou moins abondant.

➤ **Test RM et VP**

Nous avons utilisé le milieu Clark et Lubs qui permet l'étude des produits de fermentation du glucose. Nous l'avonsensemencé avec la souche bactérienne à analyser. Après avoir incubé à 37°C pendant 18 heures nous avons partagé le milieu en deux tubes pour pratiquer les deux tests :

➤ **Test VP (Voges-Proskauer) :**

La mise en évidence de la production d'acétoïne au cours de la fermentation par la voie du butane-diol en présence de réactif VP (en ajoutant quelques gouttes du réactif VP1 et le même volume du réactif VP2), l'acétoïne donne une coloration rouge en milieu très oxygéné.

➤ **Test du rouge de méthyle :**

En additionnant 2 à 3 gouttes de rouge de méthyle, la mise en évidence des fermentations acides mixtes par acidification d'un milieu glucosé et l'apparition d'une couleur rouge.

➤ **Test Urée - Indole**

C'est un milieu liquide au niveau duquel on recherche trois caractères :

La production d'uréase qui se matérialise par un changement de la coloration du jaune au rose, du fait de l'alcalinisation du milieu.

La présence d'indole qui se matérialise par un anneau rouge, après addition du réactif de Kovacs.

La présence de TDA qui se matérialise par un changement de la coloration du jaune au rouge, après addition du perchlorure de fer ( $\text{FeCl}_3$ ).

### **3. Recherche des souches sécrétrices des metallo-bêta-lactamases**

#### **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  $\text{Zn}^{2+}$  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).

#### **Technique**

A partir des cultures jeunes sur la gélose Mac Conkey 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  $10^6$  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  $10^8$  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  $\mu\text{l}$  d'imipénème à deux centimètres d'intervalle auxquels on rajoute à l'un d'eux 10  $\mu\text{l}$  d'EDTA.

#### **Expression des résultats :**

Après 16 à 18 h d'incubation à  $37^\circ\text{C}$ , les diamètres des zones d'inhibition sont notés en millimètre (mm).

#### 4. Extrait semi-purifié de bêta-lactamases

Extraction semi purifiés de bêta-lactamases ont été préparés, à partir de la souche *Pseudomonas aeruginosa* qui se sont avérées selon les résultats du test CDT, productrices de métallo-bêta-lactamases.

En pratique, 55.5 g de BHI sont rajoutés progressivement a 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 ensemenecer les cinq erlenmeyer à raison de 50 ml d'inoculum par erlenmeyer. Après addition de 25 µl 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 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. 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.

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.

## **5. Analyse quantitative des protéines dans les extraits semi-purifiés de bêta-lactamases**

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

### **Mode opératoire**

A des concentrations finales croissantes d'albumine sérique bovine (BSA) (0,1 à 2 mg/ml) et à des volumes appropriés de surnageant contenant les protéines recherchées, est rajouté à chacune 2 ml de réactif de Coomassie. Après agitation et incubation pendant 10 min à l'obscurité et à température ambiante, les absorbances des mélanges sont déterminées à 595 nm.

### **Expression des résultats :**

Les concentrations des protéines sont calculées à partir de l'équation de la courbe d'étalonnage tracé en fonction des concentrations de BSA et des absorbances relatives. Elles sont exprimées en mg protéines par ml d'extrait semi-purifié de bêta-lactamases.

## **6. Test d'inhibition des metallo-bêta-lactamase par l'extrait des feuillets d'Olea europaea**

L'objectif de ces essais est la mise en évidence, en d'un éventuel effet d'inhibition dans le cas d'extraits des feuilles d'Olea europaea qui s'avèrent douer d'effet inhibiteur de l'activité enzymatique d'extraits semi-purifiés de bêta-lactamases.

### **Mode opératoire**

Ce test nécessite tout d'abord penicilline G sous forme solution c'est à dire 0.0035 g de penicilline dans un 100 ml d'eau distille et ensuite diluée par PBS. Dans une cuve en quartz contenant 1000 µl d'extraits semi-purifiés de bêta-lactamases à partir de

*P.aeruginosa* sont rajoutés à des volumes suffisants pour 200  $\mu$ l de la pénicilline G contenant à des concentrations décroissantes. Après homogénéisation manuelle, 4  $\mu$ l d'extrait des feuilles d'*Olea europaea* sont par la suite rajoutés. Après une deuxième homogénéisation manuelle, et on suit l'évolution de l'absorbance des milieux réactionnels à 235 nm.

### **Expression des résultats**

Les vitesses initiales de réaction sont à chaque fois notées en  $\Delta A/\text{min}$  puis converties en  $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$ . Les valeurs des constantes de Michaelis (KM) et des vitesses maximales (Vm) et des constantes d'inhibitions (KI) sont déterminés à partir des courbes de lineweaver Burk tracées grâce au logiciel « SIGMAPLOT 12.0 » auquel le module de pharmacologie « Enzyme Kinetics 1.3 » a été ajouté.

*Résultat*

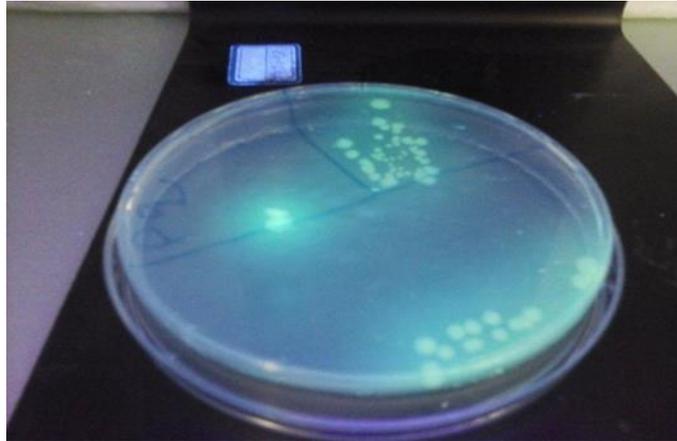
*et*

*Discussion*

## 1. Résultats des tests

### 1.1. Productions des pigments

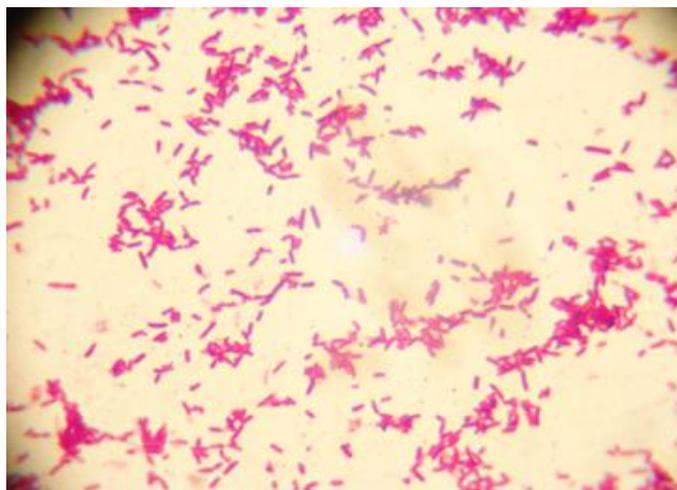
L'ensemencement sur milieu Cétrimide émis des lumières fluorescents sous la lampe UV, qui sont due à la production de pigments : pyoverdine de couleur verte.



**Figure 15** : La mise en évidence de la fluorescence sur milieu Cétrimide sous UV 366nm

### 1.2. Coloration de Gram

Résultat obtenus lors de l'étude phénotypique montrent que la souche qui on a obtenue est à Gram négative (**Fig 16**)



**Figure 16** : l'observation microscopique après coloration de gram

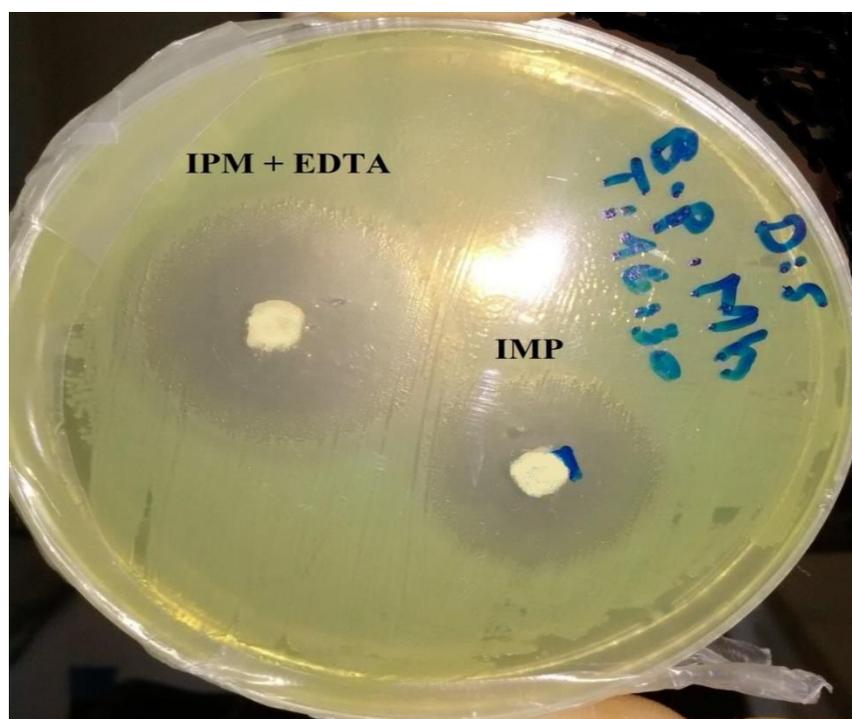
**Identification**

Tableau 1 : tableau montre resultat des tests biochimique de pseudomonas aeruginosa

<b>Caractères biochimiques</b>	<b>Résultats</b>
Recherche de l'oxydase	+
Recherche de la catalase	+
rouge de méthyle	-
Réaction de Voges-Proskauer	-
Utilisation des sucres TSI	-
le citrate de Simmons	-
Mannitol-mobilité	mobile
Test Urée - Indole	-

## 1. Test à l'EDTA

La mise en évidence d'une résistance à l'imipénème et la mise en évidence de la disparition de celle-ci, sont réalisées chez une souche sauvage par le test CDT (Combined Disk Test Imipénème-EDTA) qui consiste en l'incubation de ce dernière en présence d'imipénème seul et d'imipénème plus EDTA. La comparaison des zones d'inhibition obtenues suite à l'application de ce test montre que la souche *Pseudomonas aeruginosa* isolées et identifiées au niveau du Laboratoire (LBPVBP). Université Dr Moulay de SAÏDA, résistent à l'imipénème (diamètre des zones d'inhibition égale à 8 et 12 mm, respectivement) contrairement aux souches restantes (diamètre confondue supérieur à 20mm). Lorsqu'on rajoute de l'EDTA, cette résistance est surmonté par l'imipénème chez les deux premières souches (les zones d'inhibition augmentent presque de trois et de deux fois, respectivement). Chez le reste des souches, les zones d'inhibition demeurent presque les mêmes. L'interaction avec l'imipénème et son hydrolyse reflètent que la ou les bêta-lactamases y existantes sont de type MBLs. Ceci confirme les résultats du test CDT et les résultats du typage.

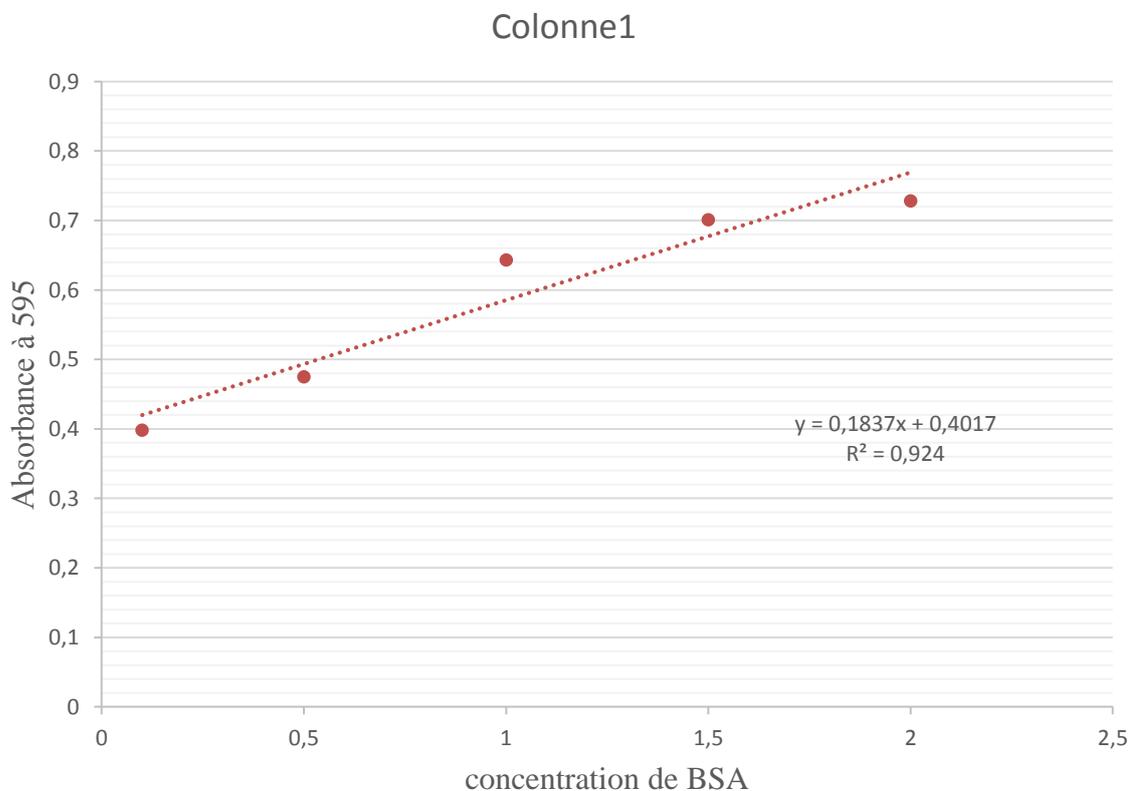


**Figure 17** : la zone d'inhibition de la croissance de bactéries testée sur Gélose Mueller Hinton, après 16 à 18 h d'incubation en présence d'imipénème seul (10 $\mu$ g) et d'imipénème (10 $\mu$ g) plus EDTA.

## 2. Extraits semi-purifiés de bêta-lactamases

### 2.1. Analyse quantitative des protéines

L'extraits semi-purifiés de bêta-lactamases ont été obtenus à partir d'homogénats (extraits bruts) de culots cellulaires bactériens de *P.aeruginosa*, ceci suite à une centrifugation, une dialyse et une concentration de ces extraits bruts. Les teneurs en protéines exprimées en mg/ml sont déterminées par la méthode de Bradford (1976) améliorée par Macart et Gerbaut (1982) qui consiste en l'incubation d'échantillons des extraits et du standard (BSA) avec le réactif de Macart, puis en la lecture de l'absorbance du mélange à 595nm. Les valeurs de ces teneurs déterminées à partir de l'équation de la courbe tracée en fonction des concentrations de la BSA et les absorbances relatives. Celle-ci ne passe pas par l'origine ( $b= 0.4017$ ) mais elle est presque linéaire dans l'intervalle de concentration du standard rapporté ( $R^2 = 0.924$ ) (**Fig. 18**). Ce teneur est de  $0.226 \pm 0.033$  mg/ml, dans l'extrait semi purifié de bêta-lactamase à partir de *P.aeruginosa*.

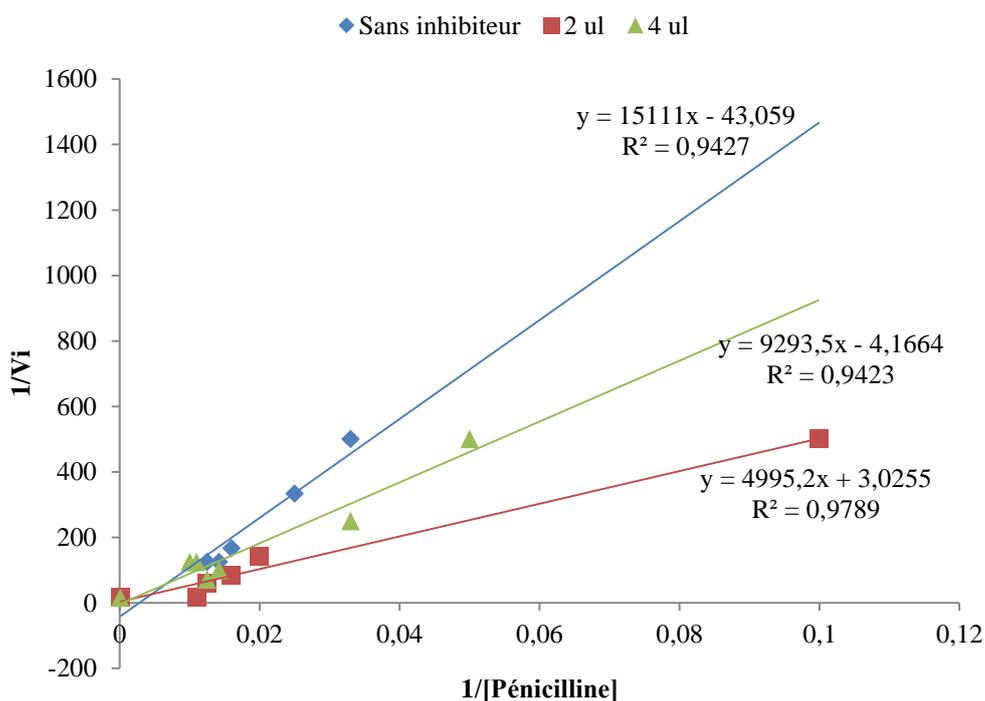


**Figure 18** : Courbe d'étalonnage de BSV pour le dosage de protéines totales

Il n'était pas possible pour nous de calculer un rendement ou un taux de protéine dans nos extraits semi-purifiés de bêta-lactamases et faire des recoupements avec des données bibliographiques. Nous nous sommes limités en conséquent à des dosages de protéine y existante et à des calculs de concentrations. Celles-ci étaient de l'ordre de 0.226 mg/ml d'extrait à partir de *P.aeruginosa*. À partir de ces concentrations, nous estimons que nos extraits sont relativement riches en protéines.

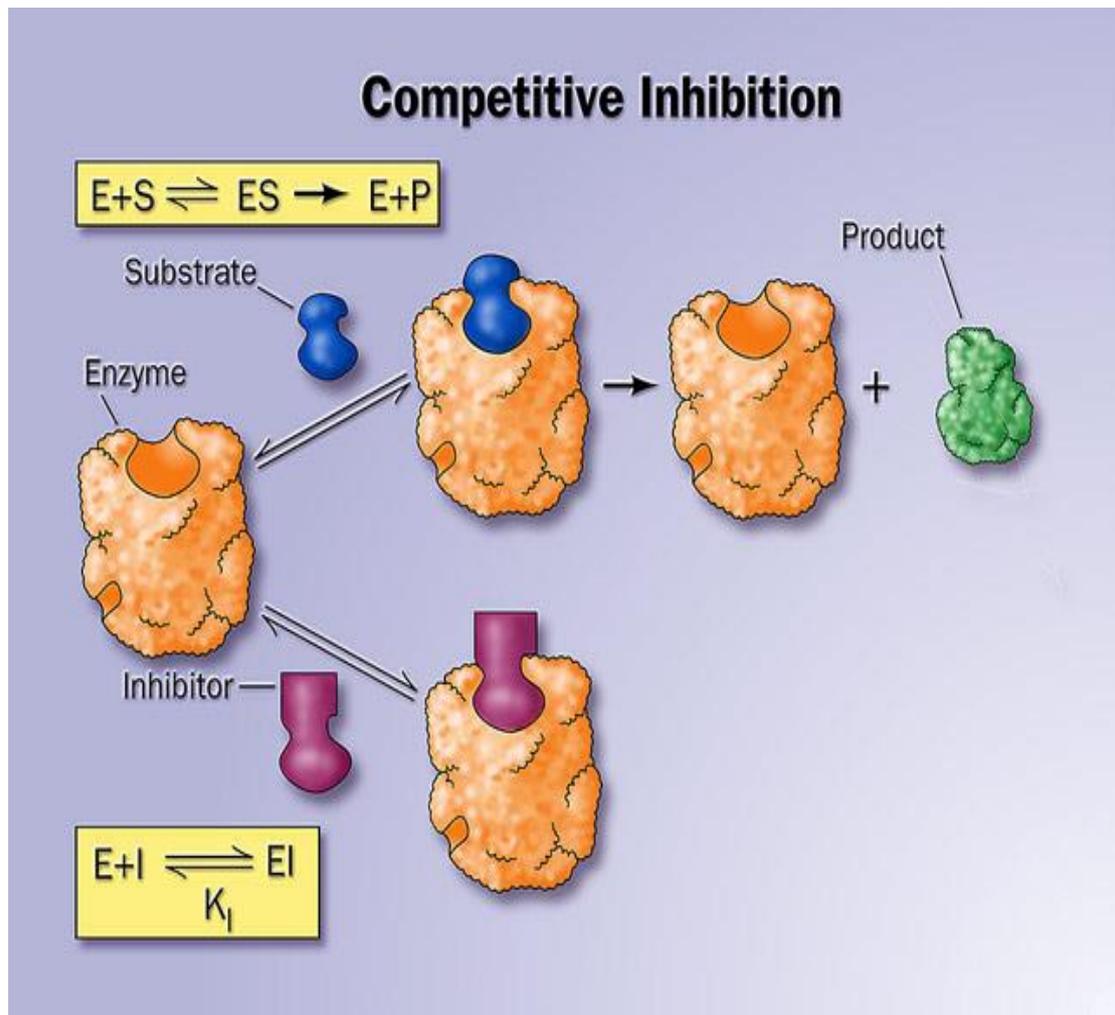
### 3. Essais d'inhibition des metallo-bêta-lactamase par l'extrait des feuilles d'Olea europaea

Dans l'extrait semi-purifié de bêta-lactamase à partir de *P.aeruginosa*, montrent que l'extrait des feuilles d'*Olea europaea* inhibe l'activité enzymatique aux concentrations dans l'ordre semblent inhiber d'une façon compétitive l'activité de l'extrait enzymatique.



**Figure 19:** Courbe de lineweaver-burk tracées en fonction de l'inverse des vitesses d'hydrolyses de concentrations finales croissantes de pénicilline G par l'extrait semi-purifié à partir de *Pseudomonas aeruginosa* en absence (◆) et en présence (▲) de concentrations 0.11 mg/ ml (■) de concentration 0.11mg/ml

C'est un résultat de test d'inhibition compétitive, ainsi appelée puisque le substrat et l'inhibiteur sont en compétition pour le même site de fixation. De manière générale, le mécanisme peut être représenté par le schéma de la figure



**Figure 20** : schéma représente le mécanisme d'inhibition compétitive

Bien que la pénicilline G et l'extrait des feuillettes d'*Olea europaea* aient une structure suffisamment proche pour se fixer sur le même site de l'enzyme,

## *Conclusion & Perspectives*

L'émergence des bactéries productrices de carbapénémase est un sujet de préoccupation pour de nombreux pays car l'implantation de telles bactéries dans nos hôpitaux conduirait à des situations dramatiques d'impasse thérapeutique. Certaines de ces enzymes sont devenues endémiques dans certains pays, comme c'est le cas pour la métallo-bêta-lactamase, Ces carbapénèmases acquises constituent actuellement sept groupes décrits chez *P. aeruginosa* : IMP (active sur l'IMiPenem), VIM (Verona Integron-encoded Metallo-bêta-lactamase), SPM (Sao-Paulo Metallo-bêta-lactamase), AIM (Australia IMipenemase), GIM (German IMipenemase) et, plus récemment NDM-1 (New Delhi Metallo-bêta-lactamase) et FIM-1. ont été impliqués par la suite dans plusieurs épidémies relativement importantes.

La solution pour la menace serait d'adopter des règles d'hygiène stricte. Pour la deuxième menace la solution serait de trouver des composés qui non seulement inhibent spécifiquement les métallo-bêta-lactamases mais de potentiel thérapeutique démontré (tolérable et non toxique sur l'organisme).

L'objectif de cette étude était d'évaluer en premier lieu de trouver une solution pour la menace serait d'adopter des règles d'hygiène stricte. Pour la deuxième menace la solution serait de trouver des composés présents dans l'extrait phénolique de (*Olea europaea*), ensuite de mettre en évidence, s'il y a lieu, l'effet inhibiteur de ces extraits sur des mettalo-bêta-lactamases isolées d'une souche bactérienne de *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. **Nous pouvons conclure que l'extrait d'*Olea europaea* inhibe compétitivement les métallo-bêta-lactamases produites par *P. aeruginosa* isolée de l'hôpital de Mascara.**

Cette étude aura donc permis d'un point de vue fondamental de mieux connaître l'importance d'extrait phénolique de plante étudiée, 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 metallo-bêta-lactamases isolées à partir d'autres souches bactériennes pathogènes.
- Recherche d'autres activités des extraits de cette plante.

*Références*

*bibliographiques*