



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-Beta-
Lactamases par des extraits des fruits du *Phoenix*
dactylifera (Deglet Noor)**

Présenté par : M_r. BERBER Mohamed

M^{lle}. ABDOUN Laounia

Soutenu publiquement le 28 /06/2016

Devant le jury :

HAMANI Houari	Maitre de conférences B	Président
BENREGUIEG	Maitre de conférences B	Examineur
Mokhtar HALLA	Maitre assistant A	r Encadreur

Année Universitaire : 2015-2016

Remerciements

Nous remercions Allah le tout puissant de nous avoir donné le courage et la patience pour réaliser ce Modeste travail.

*La première personne que nous tenons à remercier est Mr **Halla Noureddine** maitre assistant classe A à la Faculté des Sciences de l'Université Dr. Moulay Tahar d'avoir accepté de nous encadrée qui a su nous laisser la liberté nécessaire à l'accomplissement de notre recherche tout en y gardant un silcritique et avisé. Merci pour votre rigueur scientifique et vos conseils toujours judicieux et aussi d'avoir eu la patience de corriger notre mémoire et de nous avoir responsabilisées du début jusqu'à la fin de notretravail.*

Nos remerciements vont particulièrement à :

***Mr HAMANI Houari**, Maitre de conférences à la Faculté des Sciences Tahar-Saida-d'avoir accepté de présider nos jury de mémoire.*

***Mr. BENREGUIEG Mokhtar**, Maitre de conférences a faculté des sciences Tahar-saida d'avoir accepté de jury de mémoire.*

Nous remercions tous les techniciens du département de biologie qui ont nous aidé durant notre travail.

Enfin nous remercions tous qui sont participés de près ou de loin à ce travail.

Dédicace

Tout d'abord je bénis mon dieu, chaque jour de ma vie, de m'avoir donnée la chance d'étudier, de suivre la ligne droite et le bon chemin.

Je dédie ce modeste travail mes parents

Ma femme

A mon frère Baghdad,

A mon cousin Hocine

A mes sœurs fatima Z, fatiha, khaira

Et rachida

A mes amis :Med, Abdelsamed,
hamza,AEK,amine,Abdeldjalile

Boubekker,abdelhamide

Et tous me connu de proche et de lion...

Mohamed



Dédicace

Tout d'abord je bénis mon dieu, chaque jour de ma vie, de m'avoir donnée la chance d'étudier, de suivre la ligne droite et le bon chemin. Je dédie ce modeste travail,

A ma lumière, à mon bonheur, à mon amour et ma raison d'existence :

Mes chers parents: Belaouni et kabbour baghdadia

A mes sœurs : fatiha,halima, sawagia, faiza,kaltoum, et khaira.

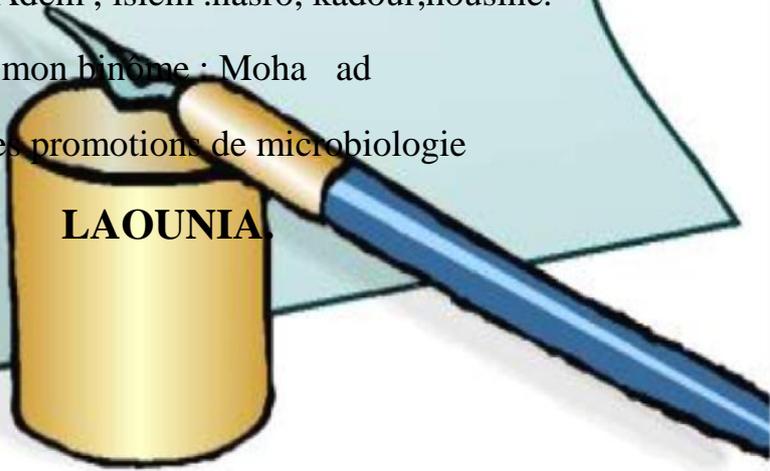
A mes frères :Boumedién, Benoumeur.

A tous mes amies : Fatima, hasiba,Hafsa, Khaira, fadila,Sara, Omelkhir,Faiza,Amina,Soumia, Mahmoud,Miloud, Zakaria, ,Madani, merzougue,Sofiain Abdelkarime aboun,mostapha, Abdelhakime, med ali ,B uya, Abdou,AEK ,Adem , islem .nasro, kadour,housine.

A mon binôme : Mohamad

A tous les promotions de microbiologie

LAOUNIA



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. Nous avons montré qu'un certain nombre d'espèces du genre *Pseudomonas* possèdent naturellement sur leur chromosome des gènes codant pour des carbapénèmases et en constituent donc le réservoir. Ces enzymes devenues les plus répandues et les plus significatives chez *P. aeruginosa*. 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 mais de 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-beta-lactamase à partir de fruits secs de *Phoenix dactylifera*L. l'autre extraits semi-purifiés de bêta-lactamases, à partir d'une souche *Pseudomonas aeruginosa* (isolats cliniques) identifiées, par le test CDT (CombinedDisk Test Imipenème-EDTA) qui consiste en l'incubation de ces dernières en présence d'imipenème seul et d'imipenème plus EDTA. Les analyses montrent que Les rendements des extraits méthanoïque (flavonoïdes) faibles parrapport aux extraits (procyanidines) 23.39et48.91% respectivement. 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 à13 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 de(*Phoenix dactylifera*L).

Mots clés: Metallo-bêta-lactamase, Imipenème, l'extrait de(*Phoenix dactylifera*L)., test CDT

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. We showed that a certain number of species of the *Pseudomonas* kind have naturally on their chromosome of genes coding for carbapénémases 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 to the threat these bacteria are to find compounds that not only specifically inhibit metallo-beta-lactamases, but therapeutic potential we have tried in our work to search for a possible inhibitory effect of the activity of metallo-beta-lactamase from dried fruit *Phoenix dactylifera*L..Two extracts were prepared: acetone extracts (procyanidin) and methanoic extracts (flavonoids) from dried fruit *Phoenix dactylifera*L. and a semi-purified extract of beta-lactamases, from a *Pseudomonas aeruginosa* strain (clinical isolates) identified by the test CDT (Combined Disk test imipenem-EDTA) which consists in incubating them in the presence of only imipenem and imipenem plus EDTA. Analyses show that yields ethanoic extracts (flavonoids) low compared with extracts (procyanidin): respectively against 23.39 and 48.91%.

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 à 13 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

Key words: Metal-worker-beta-lactamase, Imipenème, the extract of the *Phoenix dactylifera*L, test CDT

لكاربابينيمات في جنس *Pseudomonas* ذكرت على نحو متزايد في جميع أنحاء العالم غالباً ما ترتبط بإنتاج بيتا من بيتا فلزية. لقد أظهرنا أن عدداً من الأنواع من *Pseudomonas* تمتلك بطبيعة الحال على صبغياتها جينات ترم *carbapenemases*. وأصبحت هذه الانزيمات الأكثر انتشاراً والأكثر

أهمية *pseudomonas aeruginosa* لديها في موقعهم كاتيون ضروري لنشاطهم الذي هو دائماً الزنك. وبالإضافة إلى ذلك، هو هذه هي الانزيمات فلزية، والتي لها نشاط محفز أقوى بكثير من غيرها من (EDTA).

بيتا جميع بيتا كتمام إلا أرتريونام. الحلل خطر هذا البكتيريا سيكون للعثور على المركبات لها خصائص *chélateur* لمنع تحديداً فلزية بيتا لكن بإمكانات علاجية (مقبولة وغير سامة). لبحث عن تأثير كايح ممكن لنشاط فلزية بيتا لاكتاماز.

طريق مستخرجات : اثنين (الفلافونويد بروسيانيدين) فاكهة التمر المجففة (*phoenix dactylefera*) يسترد المستخرج عن طريق التبخر مذيبات العضوية وغيرها

شبه نقيته من بيتا لاكتاماز من *pseudomonas aeruginosa*) اختبار إيميبينيوم-EDTA. الذي ي تحضين هذه الأخير في وجود إيميبينيوم وحيد وإيميبينيوم بالإضافة إلى EDTA. ظهرت التحاليل (الفلافونويد) (بروسيانيدين):

23.39 48.91 علالتوالي.

مقارنة بين مناطق تثبيط التي تم الحصول عليها بعد تطبيق هذا الاختبار، يدل على أن السلالة المنتجة للفلزية وسيرين بيتا قبل قطر منطقة التثبيط (يفوق 13). وتشير التحليلات الكمية والنوعية أن تخرج شبهنقية بيتا لاكتاماز من *pseudomonas aeruginosa* بالبروتين ونشاطها نزيمة EDTA، البنسلين المائي. أو بيتا الواردة فيه يمكن أن يكون نوع من MBL فاكهة التمر

(*phoenix dactylefera*).

: فلزية بيتا لاكتاماز، إيميبينيوم، مستخلص فاكهة التمر (*phoenix dactylefera*) CDT.

LISTE DES ABREVIATIONS

AIM	Adelaide IM ipenmase
Asn	Asparagine
BC I	Bacillus cereus type I
BC II	Bacillus cereus type II
BlaB-1	B-lactamase classe B1
BlaB-2	B-lactamase classe B2
BlaMBL	B-lactamase Métallo- Beta-Lactamase
BHI	Brain H eart I nfusion
BSA	Albumine Sérique B ovine
CBBL	Classe B B eta- L actamase
CDT	Combined D isc T est
CphA	C ephalosporinase
DIM	Dutch IM ipenemase
EDTA	Acide E thylène D iamine T étraacétique
E. M	E xtrait M éthanolique
FEZ	Fluoribacter E ndogenous Z inc beta-lactamase
FIM	Florence IM ipenmase
GIM	German IM ipenemase
Gly	Glycine
GOB	<i>Chryseobacterium</i> menin GO septicumclasse B
ImiS	Imi pénèmasede <i>Aeromonas</i> S obria
IMP	IMi Pénème

IND	IND ologene M étallo- B êta-Lactamase
IC50	Inhibitor concentration required to reduce enzyme activity by 50%
Ki	Inhibitor dissociation constant
KHM	K yorin H ospital M étallo-enzyme
L1	Beta- L actamase
L2	Beta- L actamase
MBL	M étallo- B êta- L actamase
NDM	New Delhi M étallo- B êta-Lactamase
SBL	Serine B êta- L actamase
SFB	S hewanella F rigidimarina cl asse B
Sfh	S erratia f onticolacarbapenem h ydrolase
SIM	Seoul I Mipénémase
SPM	Sao P aulo M étallo-enzyme
TMB	Tripoli M étallo- B êta-Lactamase
VIM	V érona I ntegro-encoded M étallo- B êta- Lactamase

SOMMAIRE

INTRODUCTION	01
--------------------	----

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. LES METALLO-BETA-LACTAMASES.....	05
--	-----------

Historique.....	06
-----------------	----

Terminologie et définition	07
----------------------------------	----

Classification	08
----------------------	----

Principales caractéristiques des MBLs des groupes 3a, 3b et 3c.....	09
---	----

Principales caractéristiques des MBLs des sous-classes B1, B2 et B3	09
---	----

Structure.....	10
----------------	----

Structure moléculaire commune	10
-------------------------------------	----

I.5. Mécanisme d'action.....	15
------------------------------	----

I.6 Epidémiologie.....	17
------------------------	----

II. LES INHIBITEURS DE METALLO-BETA-LACTAMASES

II -2 -Inhibiteurs de Dicarboxylate	19
---	----

II -3- Inhibiteurs de cétone et d'alcool de Trifluorométhyl	23
---	----

II -4- Inhibiteurs de sulfonamide	25
---	----

III. Plante étudiée : *Phoenix dactylifera*

Présentation de la plante	28
---------------------------------	----

Position systématique	29
-----------------------------	----

Composition biochimique.....	30
------------------------------	----

III.3. 1 Composition biochimique de la partie comestible "Pulpe	30
---	----

III.3.1.1. Constituants majeurs	30
---------------------------------------	----

III 3.1.2. Constituants mineurs.....	36
--------------------------------------	----

III.2 Composition biochimique de la partie non comestible "Noyau "	38
--	----

MATERIEL ET METHODES

I. Matériel végétale	41
-----------------------------------	-----------

I.1.1. Choix de la variété.....	41
---------------------------------	----

I.2 Matériel biologique	41
-------------------------------	----

I.2. Souches étudiées	42
------------------------------------	-----------

II. Méthodes.....	42
--------------------------	-----------

Préparation des extraits de dattes.....	42
II.1.1 traitement des échantillons.....	42
Récolte et séchage.....	42
Extraction de flavonoïdes glycosides	43
Extraction des procyanidines.....	43
Isolement et identification des Pseudomonas	45
Prélèvements.....	45
Identification.....	45
Les caractères cultureux (Examen macroscopique).....	45
.Observation de la fluorescente sous UV	47
L'examen microscopique	47
Observation à l'état frais.....	47
Coloration de gram	47
Test de confirmatif.....	48
Test biochimiques.....	48
Oxydase	48
Catalase.....	49
Mannitol mobilité	49
Citrate de Simmons.....	50
Le milieu TSI.....	51
Dégradation des sucres	51
Le milieu Urée – Indole.....	52
Recherche de sécrétrice de métallo-beta-lactamases par le test CDT.....	52
Extraction semi-purifié de beta-lactamases	53
Analyses quantitatives	54
Analyse quantitative des protéines dans les extraits semi-purifiés de beta-lactamases.....	54
RESULTATS ET DISCUSSIONS.....	55
1 .Caractéristiques de la matière première (<i>Deglet-Nour</i>).....	56
1.1 Caractéristiques morphologiques de la datte	56
2. Obtention et caractérisation des extraits de datte fraîche.....	56
Couleurs et aspects des extraits	56
2. 2.Rendement	56
3. Résultats d'analyses microbiologiques	58
Identification phénotypique	58
4. Détection phénotypique de métallo-bêta-lactamases par le test CDT	61
5. Extraits semi-purifiés de bêta-lactamases	61
6. Analyse quantitative des protéines	61
7. Essais d'inhibition de l'activité enzymatique par flavonoïdes de commerce et deux extraits de fruits secs de <i>Phoenix dactylifera</i>	62
Conclusion	64
Références bibliographiques.....	67
Annexes.....	75

LISTE DES TABLEAUX

Tableau.1: les résidus d'acides aminés du site actif des trois sous-classes MBLs coordonnés avec lesions du zinc	15
Tableau.2 Valeurs de K_i (dans le μM) contre trois MBLs (sous-classes B1 et B3).	24
Tableau.3: Activité inhibitrice de divers 2 hydroxynaphthyl, de 2 methoxynaphthyl et de dérivés d'anthracenyl contre IMP-1	26
Tableau. 4: Teneuren eau de quelques variétés de dattes de la région Fliache (Biskra), en %	30
Tableau. 5 : Teneur en sucres de quelques variétés algériennes	31
Tableau. 6: Composition moyenne en acides aminés de la datte sèche.....	32
Tableau. 7: Composition en acides gras de la datte Deglet-Nour, en % de matière grasse.....	33
Tableau. 8 : La composition minérale de la datte sèche	33
Tableau. 9: Teneur en minéraux et vitamines pour 100 g de pulpe.....	34
Tableau. 10: Principaux pigments colorés se trouvant dans les dattes	38
Tableau. 11: Caractéristiques physiques de la datte Deglet-Nour	38

LISTE DES FIGURES

Figure.1 : Hydrolyse des antibiotiques par l'enzyme de β -lactamase	07
Figure.2: Classification d'Ambler de β -lactamases.....	08
Figure. 3 : Structure monomérique d'une MBL de <i>Aeromonashydrophila</i> (CphA) reconstitué en rubans. L'ion zinc est présenté comme une sphère verte	12
Figure. 4 : Structure tétramérique d'une MBL de <i>Stenotrophomonasmaltophilia</i> (L1) reconstitué en rubans. Les ions zinc sont présentés comme des sphères grises et les sous-unités individuelles identifiées par couleur	12
Figure. 5 : La structure reconstituée d'une métallo-beta-lactamase de la sous-classe B1, forme Mononucléaire (<i>Bacillus cereus</i> II); (B): schéma du site actif indiquant les acides aminés coordonnés à l'ion de zinc avec leur position.....	14
Figure. 6 : La structure reconstituée d'une métallo-beta-lactamase de la sous-classe B1, forme bi-nucléaire (<i>Bacillus cereus</i> II); (B): schéma du site actif indiquant les acides aminés coordonnés au premier et au deuxième ion zinc avec leurs positions .	14
Figure. 7 Le mécanisme catalytique proposé de mono-zinc pour MBLs avec la pénicilline.....	16
Figure. 8 : Le mécanisme catalytique proposé de Di-zinc pour MBLs avec de la pénicilline.....	16
Figure. 9 : Epidémiologie mondiale des MBLs	17
Figure. 10: Inhibiteurs d'acide phtalique contre IMP-1	20
Figure. 11 L'activité IMP-1 inhibitrice de 4 a substitué les dérivés acides phtaliques.	21
Figure. 12: Trois inhibiteurs efficaces de dicarboxylate contre l'enzyme IMP-1..	21
Figure. 13: Inhibiteurs de Dicarboxylate contre IMP-1	22
Figure. 14: La structure cristalline d'IMP-1 Co-crystalized avec l'inhibiteur efficace	23
Figure. 15 Cétones de Trifluoromethyl et inhibiteurs d'alcools contre metallo- lactamases	24
Figure. 16 : Datte et noyau du palmier dattier	29
Figure.17: .structures des procyanidines actuels dans les dates.....	35
Figure.18 : structures des flavanoïdes actuelles dans les dates.....	36
Figure.19: principale étapes d'extraction de dattes	44
Figure.20: Schéma général de caractérisation du groupe <i>Pseudomonas fluorescens</i> -46	
Figure.21: schéma générale de la procédure d'isolement, et d'identification des isolats bactériens	46
Figure.22: Comparaison des rendements des deux extraits (en% du poids frais)	46
Figure.23: morphologie macroscopique de S sur Mac cankey	57
Figure.24: l'observation microscopique après coloration de gram	58
Figure.25: La mise en évidence de la fluorescence sur milieu Cétrimide sous UV	
366nm.....	59
Figure.26 les zones d'inhibitions de la croissance des bactéries testées sur Gélose Mueller Hinton,.....	61
Figure.27: Courbe d'étalonnage de BSV pour le dosage de protéines totales	62
Figure.28: 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</i>	63

Introduction

Introduction générale

Lorsque notre corps est débordé par l'attaque de bactéries, l'organisme ne peut pas toujours se défendre seul, il a besoin d'aide. Les antibiotiques sont donc parfois nécessaires pour éliminer les bactéries ou empêcher leur prolifération et renforcer les défenses du corps. Il existe plusieurs classes d'antibiotiques en usage actuellement, les bêta-lactamines sont à juste titre les antibiotiques les plus prescrits en médecine générale à cause de leur efficacité thérapeutique et leur tolérance.

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 (bêta-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 -lactame des antibiotiques de la famille des bêta-lactamines, donnant un produit biologiquement inactif qui perd totalement son activité antimicrobienne (MATAGNE ET AL., 1998).

Introduction générale

Ces enzymes sont divisées en deux grands groupes, les serine-bêta-lactamases et les métallo-bêta-lactamases dont l'activité revient essentiellement à l'acide aminé serine du site actif et à un ou deux atomes de zinc, dans l'ordre. Plus de 80 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 de fruits secs de *Phoenix dactylifera L.*

Première partie

*Revue
bibliographique*

Chapitre 1

Les métallo-bêta-lactamases

1. Historique

En 1966, Sabath et Abraham avaient mis en évidence une activité céphalosporinase dans des préparations brutes de pénicillinases, à partir de *Bacillus cereus* 569 (bactérie du sol non pathogène). Ces deux chercheurs ont constaté que cette activité perdue au cours de la purification, est restaurée par addition du sulfate de zinc (1 mM finale) Selon ces auteurs cette activité céphalosporinase revenait à une enzyme chromosomique (Sabath and Abraham, 1966). Pendant une période relativement longue (20 ans), ce type d'enzyme a été considéré beaucoup plus comme une curiosité biochimique que comme cause déterminante de résistance sans importance clinique. Durant la même période bien que l'absence d'analogie structurale et mécanistique avec les serine beta-lactamases, elle était intéressante pour des enzymologistes et des scientifiques de protéines, l'occurrence de ce type d'enzymes dans des espèces bactériennes connues comme non pathogènes n'a, cependant, pas attiré l'attention des cliniciens et des microbiologistes cliniques (Chantalat *et al.*, 2000; Rossolini et Docquier, 2007).

Durant les années 1980, la découverte de ce type d'enzyme dans des espèces de pertinence clinique c'est-à-dire pathogène (*Stenotrophomonas maltophilia*; quelques souches de *Bacteroides fragilis* et *Aeromonas spp*) a progressivement changé ce point de vue. Par conséquent, un intérêt important a été accordé par la suite à ce type d'enzyme, incité par deux propriétés relatives fonctionnelles à savoir l'activité carbapénèmase et l'insensibilité aux inhibiteurs classiques de beta-lactamases à serine (acide clavulanique, acide pénicillanique, sulfones). En 1982, Saino et ses collaborateurs mirent en évidence dans des souches de *Stenotrophomonas maltophilia* (bacille à Gram négatif n'appartenant pas aux entérobactéries) une activité pénicillinase prépondérante et dégradante de l'imipénème. Cette activité revient, en fait, à une enzyme chromosomique inductible et n'est activée qu'en présence du zinc. Pour ces chercheurs il s'agit d'une métallo-enzyme qu'ils ont désignée beta-lactamase 1 (L1) (Saino *etal.*, 1982).

L'existence de cette activité imipénèmase n'est confirmée qu'à partir du début des années 90, lorsqu'ils ont publié en 1991 qu'une souche de *Pseudomonas aeruginosa* isolée au Japon (Bush, 1998; Zubair *et al.*, 2011) en 1988 était résistante à l'imipénème par suite de la synthèse d'une métallo-enzyme désignée IMP-1, une enzyme plasmidique transférable (Cornelis, 2008) qui conférait la résistance à toutes les beta-lactamines sauf l'aztréonam

(Watanab *et al.*, 1991). Cette métallo-enzyme qui constitue en fait la première métallo-beta-lactamase fut ensuite identifiée dans certaines entérobactéries (*Klebsiella pneumoniae*). D'autres MBL du type IMPet VIM, GIM-1, KHM-1, IND-1 ... et dernièrement (en 2009) la New Delhi Métallo-beta-lactamase (NDM) et la Florence Imipenèmase (FIM-1) (en 2012) (Pollini *et al.*, 2013) ont été identifiées dans les entérobactéries et leurs gènes très mobiles sont à l'origine de bouffées épidémiques.

Terminologie et définition

Les -Lactamases sont des enzymes produites par les bactéries qui sont responsables de la résistance bactérienne aux antibiotiques de -lactam. L'acte de -lactamases en fendant l'anneau de lactame et en mettant les propriétés antibactériennes de la molécule

(Figure 1) (T.Viswanatha *et al.*, 2008)

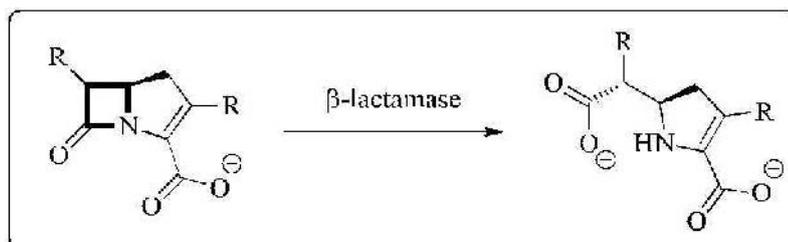


Figure 1- Hydrolyse des antibiotiques par l'enzyme de -lactamase à traduire en français

L'enzyme de -lactamase a été identifiée la première fois dans *Escherichia coli* par Abraham et chaîne en 1941 (John Wiley & Sons, 1993.) . Cependant, le groupe n'était pas réussi en isolant l'enzyme jusqu'à quatre ans après quand une enzyme de -lactamase a été avec succès isolée par Kirby de *Staphylococcus aureus*. Les métallo-beta-lactamases sont connues par de nombreux termes : (i) les métallo-beta-lactamases (MBL) parce qu'elles nécessitent un métal pour agir sur le noyau lactame des beta-lactamines (contrairement aux béta-lactamases à sérine) (Sharma, 2007); (ii) Zn-beta-lactamase parce qu'elles nécessitent le zinc pour leur fonctionnement; (iii) beta-lactamases de la classe B (CBBLs) parce qu'elles sont sensible à l'EDTA et insensible à l'acide clavulanique (contrairement aux classes A, C et D) selon la classification d'Amblar (Galleni *et al.*, 2001); (iv) les béta-lactamases du groupe trois parce qu'elles sont efficaces sur les carbapénèmes; (v) les carbapénèmases parce qu'elles sont efficaces sur les carbapénèmes (Imipenème, Ertapenème, Doripenème, Meropenème). (Rossolini et Doccquier, 2007).

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

Classification

Il y a différents arrangements de classification pour les enzymes de β -lactamase qui sont basées sur l'homologie d'ordre d'acide aminé, les profils de substrat et d'inhibiteur ou les caractéristiques fonctionnelles. La classification proposée par Ambler divise les β -lactamases en enzymes zinc-contenantes (classe B) et sérine β -lactamases (classes A, C, D) basé sur l'homologie d'ordre d'acide aminé (**Figure 2**) Les structures cristallines de quelques enzymes sont disponibles à la banque de données de protéine (PDB). [32]

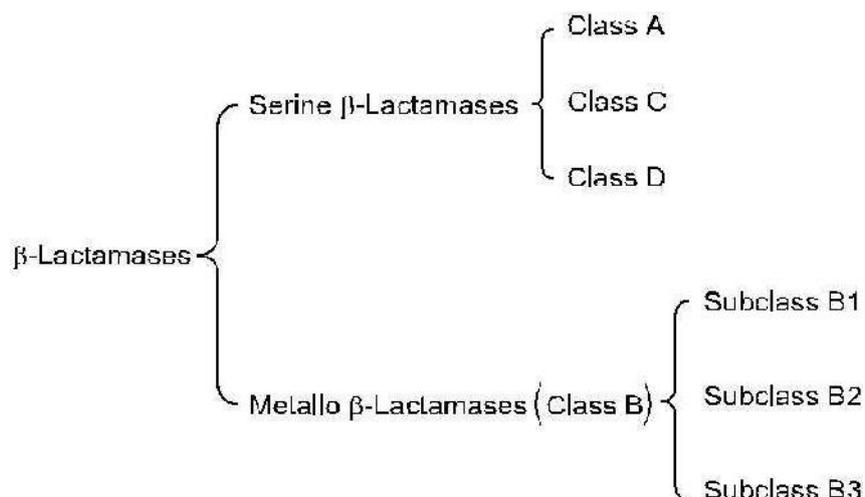


Figure 2 : Classification d'Ambler de β -lactamases. (L. Roux *et al.*, 2010)

En 1989, Bush avait proposé une autre classification dans laquelle il séparait également les métallo-beta-lactamases des sérine beta-lactamases. Pour cet auteur, le premier type constitue un seul groupe appelé groupe 3; le second type est y divisé en trois groupes 1, 2 et 4; ceci en fonction de leurs propriétés fonctionnelles à savoir le profile substrat et leurs sensibilités à l'EDTA et à l'acide clavulanique. Cette classification a été mise à jour entre 1995 et 1997 pour accueillir le nombre croissant des enzymes du groupe 3 (Bush *et al.*, 1995 ; Rasmussen et Bush, 1997). Dans cette mise à jour, le groupe 3 a été subdivisé

entres sous-groupes : groupe 3a, groupe 3b et le groupe 3c sur la base de leurs capacités à hydrolyser les imipénèmes et autres bêta lactamines. Tout comme le groupe 3, la classe B a été également subdivisé en trois sous classes: B1, B2 et B3 sur la base de leurs structures moléculaires primaires, et des structures de leurs sites actifs (Brown *et al.*, 2011).

Principales caractéristiques des MBLs des groupes 3a, 3b et 3c

Groupe 3a: les MBLs de ce groupe ont un large spectre d'activité, elles hydrolysent efficacement les pénicillines puis les imipénèmes. Les céphalosporines sont également bien hydrolysées par ces enzymes, mais pas aussi bien que les imipénèmes. (Rasmussen et Bush, 1997)

Groupe 3b: ce sont les vrais carbapénèmases car elles ont une haute spécificité pour les carbapénèmes (Rasmussen et Bush, 1997)

Groupe 3c: les enzymes de ce groupe hydrolysent spécifiquement les céphalosporines d'où leur deuxième dénomination " céphalosporinases " (Rasmussen et Bush, 1997; Sharma, 2007; Gupta, 2008).

Principales caractéristiques des MBLs des sous-classes B1, B2 et B3

Sous-classe B1: le mécanisme catalytique des enzymes de cette sous classes nécessitent deux ions zinc coordonnés à trois résidus histidines et un résidu cystéine (Walsh *et al.*, 2005 ; Gupta, 2008). Cette catégorie comprend la plupart des métallo-beta-lactamases connues : métallo-beta-lactamases provenant de *Bacillus cereus* ou autres *Bacillus spp* (BcII), et de *P aeruginosa*, VIM, GIM et SPM-1... (Carfi *et al.*, 1995; Galleni *et al.*, 2001), IMP (Ricchio *et al.*, 2001),

Sous-classe B2: par comparaison aux enzymes de la sous classes 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). Elle inclut surtout les enzymes produites par diverses espèces de *Aeromonas* (ACSP, SIG, ACSP2, Cph A), (Garau *et al.*, 2005) et de *Serratia* (SFH-I) (Gupta 2008).

Sous-classe B3: par comparaison aux deux premières sous-classes dont les MBLs sont des molécules monomériques (Fig . 3), cette sous-classe comprend les MBLs tétramériques (Walsh *et al.*, 2005). A titre d'exemple nous citons celles produites par : *Stenotrophomonas*

maltophilia (L1), *C.meningosepticum* (GOB), *Legionella gormanii* (FEZ-1), *Marcescens Serratia* (SMB-1) , (Wachino *et al.*, 2013).

Structure moléculaire commune

Les métallo-beta-lactamases sont des hydrolases qui contiennent en moyenne 230 résidus d'acides aminés. Leurs poids moléculaires varient entre 25 et 118 KDa; leurs point

Isoelectrique varient entre 2,5 et 10,5.

Comme il a été rapporté dans leur classification, ce groupe d'enzyme est subdivisé en trois sous-classes B1, B2 et B3 selon le pourcentage d'homologie de structures primaires

(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 (Garau *et 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 α (hélices), des structures β (feuillettes) et des boucles dont leurs nombres sont de 5, de 12 et de 1, dans l'ordre.

Malgré la faible analogie de leurs structures primaires, toutes les MBLs connues présentent une structure tertiaire de type α/β composée de deux feuillettes β centraux et cinq hélices α 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 (ou en pli) de type β / β' (Gonzalez *et al.*, 2007) qui est à titre indicatif complètement sans rapport avec celle des serine betalactamases (Dugal et Fernandez(2011))

La structure présente une symétrie double interne apportée par deux domaines indépendants reliés entre eux par une boucle de 8 résidus d'acides aminés (121 à 128)(Heinz etAdolph, 2004); leur site actif se trouve dans le sillon peu profond à l'interface des deux domaines (Majiduddin *et al.*, 2002). Toutes les structures de MBLs présentent un pli global similaire avec des feuillets et des hélices dans l'ordre suivant: 1 2 3 4 (5) 1 5 (6) 2 6 (7) 3 pour le domaine N-terminal et (7) 8 9 10 11 4 12 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 (Fig. 4) (Rossolini et Docquier, 2007; Hu *etal.*, 2008).

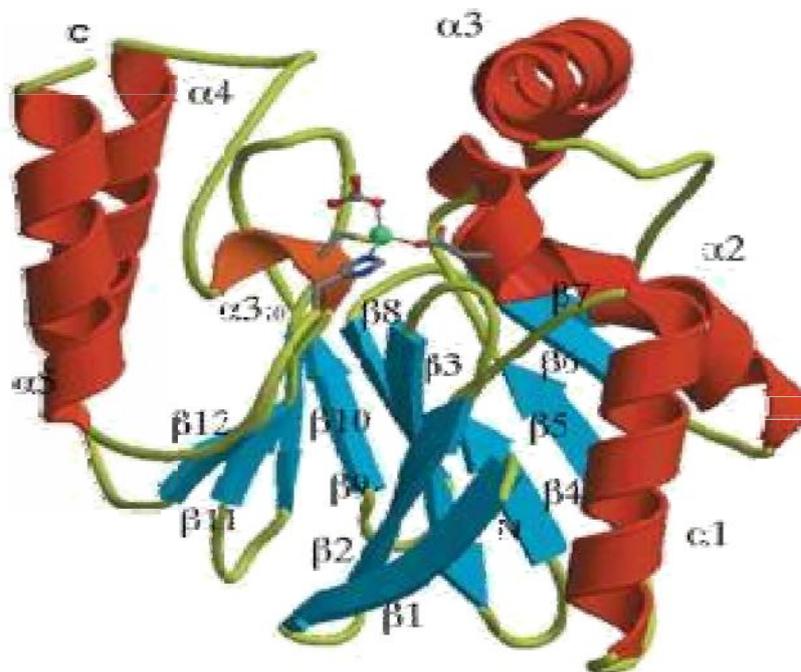


Figure. -3 : Structure monomérique d'une MBL de *Aeromonas hydrophila* (CphA) reconstitué en rubans. L'ion zinc est présenté comme une sphère verte (Garau *et al.*, 2005).

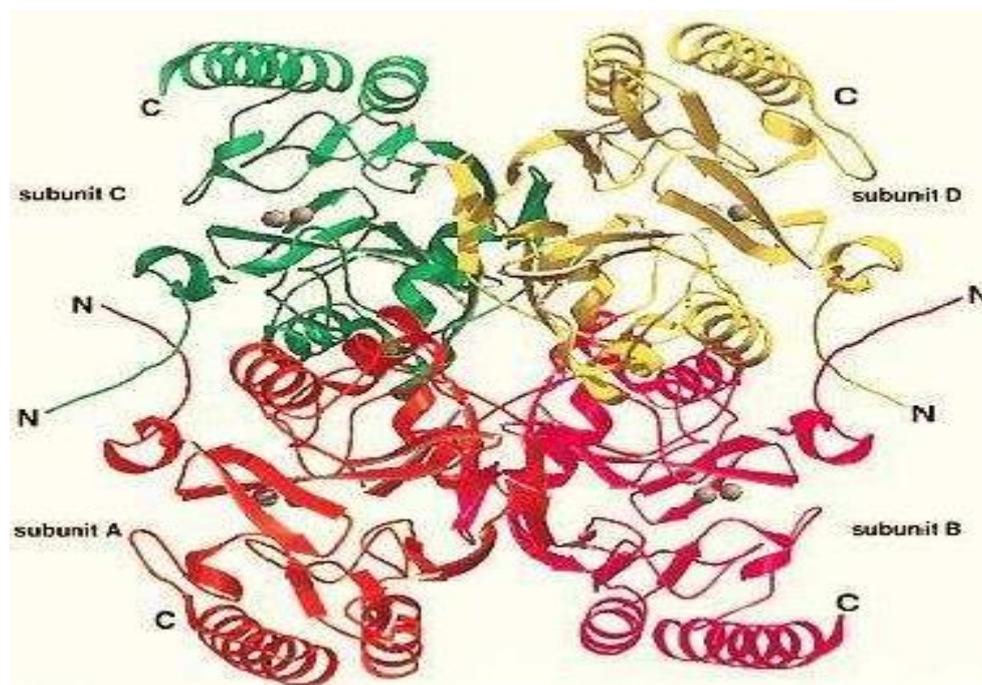


Figure. -4: Structure tétramérique d'une MBL de *Stenotrophomonas maltophilia* (L1) reconstitué en rubans. Les ions zinc sont présentés comme des sphères grises et les sous-unités individuelles identifiées par couleur (Ullah *et al.*, 1998).

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. MBLs confondues, ces acides aminés sont fréquemment l'asparagine, la cystéine et trois à cinq histidines. Dans la sous-classe B1, le site actif peut être mononucléaire, autrement dit les acides aminés établissent des liaisons avec un seul ion de zinc. Il peut être également bi-nucléaire, autrement dit les acides aminés établissent des liaisons avec deux ions de zinc. Dans le cas du site mono-nucléaire, les acides aminés établissant des liaisons avec le seul ion zinc sont trois résidus histidines (**Figure. 5**). Dans le cas du site bi-nucléaire, les acides aminés établissant des liaisons avec le premier ion zinc sont trois histidines; avec le deuxième ion zinc sont des résidus d'asparagine, de cystéine et d'histidine (Abriata *et al.*, 2008)

(**Figure. 6**). Dans la classe B2, le site actif est toujours du type mononucléaire.

Les acides aminés établissent des liaisons avec le seul ion de zinc sont des résidus d'asparagine, de cystéine et d'histidine (Page et Badarau, 2008). Enfin, dans la classe B3, le site actif peut être mono ou bi-nucléaires. Dans le cas du site mono nucléaire, les acides aminés établissant des liaisons avec le seul ion zinc sont trois 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 sont des résidus d'histidine, de sérine et d'histidine (**Tab.1**).

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

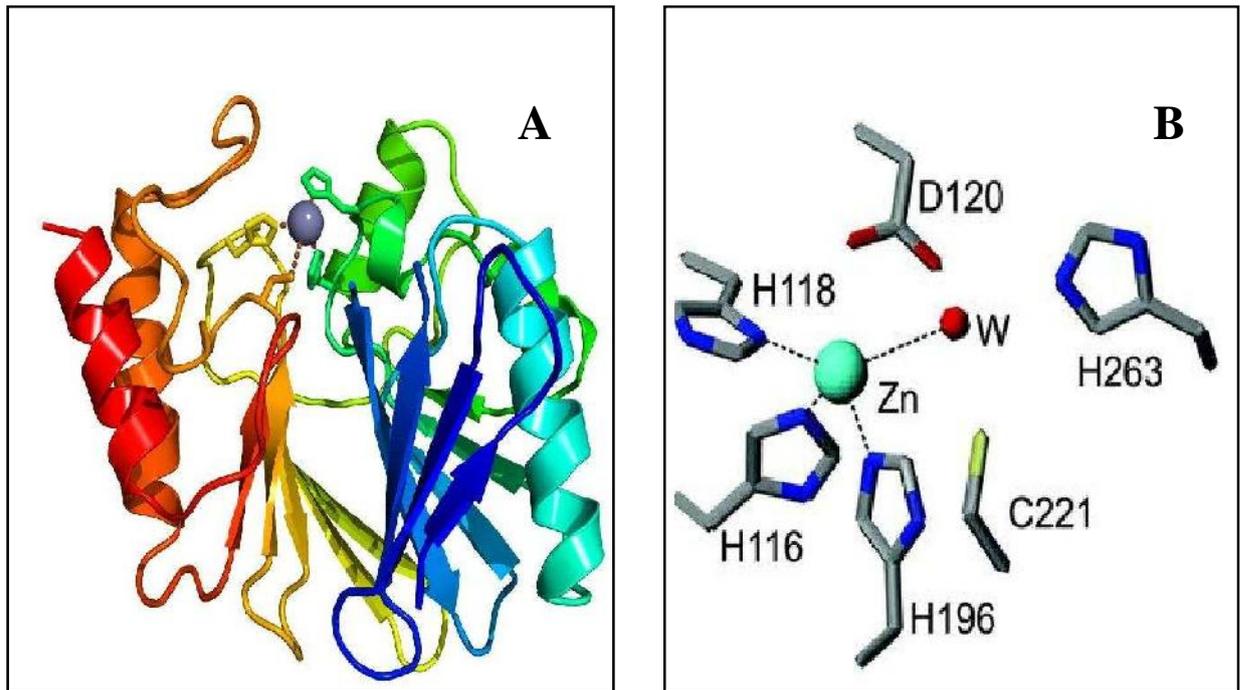


Figure. 5 : (A) : La structure reconstituée d'une métallo-beta-lactamase de la sous-classe B1, forme Mononucléaire (*Bacillus cereus* II); (B): schéma du site actif indiquant les acides aminés coordonnés à l'ion de zinc avec leur position (Karsisiotis *et al.*, 2014).

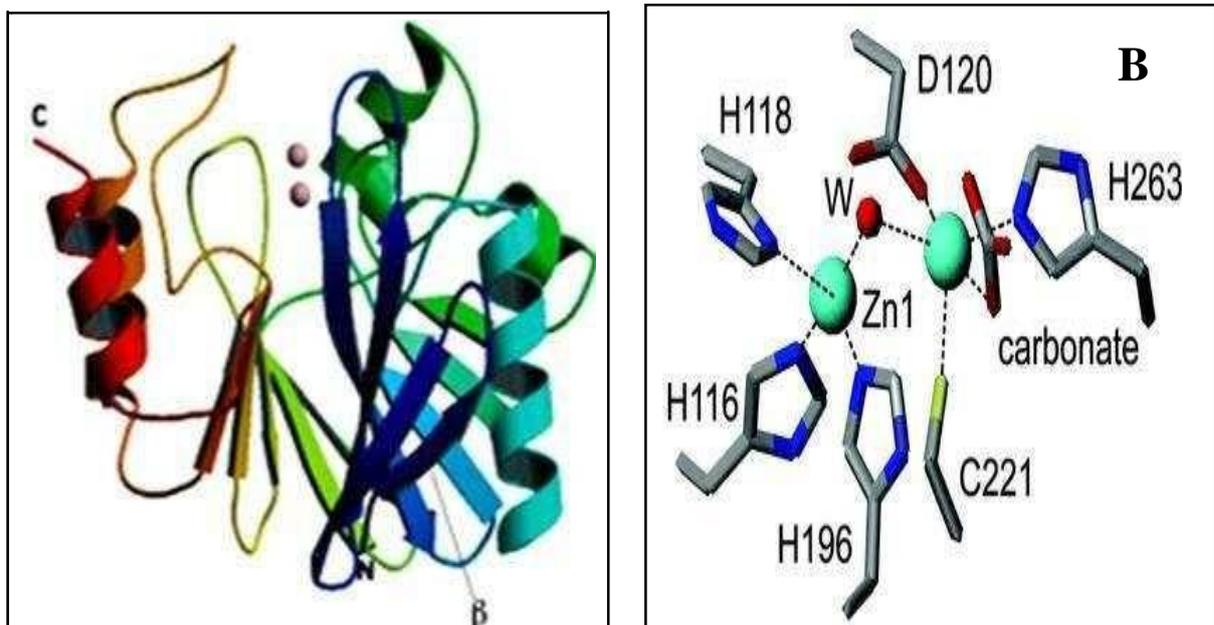


Figure. 6 : (A) : La structure reconstituée d'une métallo-beta-lactamase de la sous-classe B1, forme bi-nucléaire (*Bacillus cereus* II); (B): schéma du site actif indiquant les acides aminés coordonnés au premier et au deuxième ion zinc avec leurs positions (Karsisiotis *et al.*, 2014).

Tableau.1: les résidus d'acides aminés du site actif des trois sous-classes MBLs coordonnés avec les ions de zinc (Galleni *et al.*, 2001).

-lactamases	Les ligands Zn1			Les ligands Zn2		
Sous classe B1						
Consensus BBL*	His116	His118	His196	Asp120	Cys221	His263
Bc II	His86	His88	His149	Asp90	Cys168	His210
IMP-1	His77	His79	His139	Asp81	Cys158	His197
CcrA	His99	His101	His162	Asp103	Cys181	His223
VIM-1	His88	His90	His153	Asp92	Cys172	His214
BlaB	His76	His78	His139	Asp80	Cys158	His200
IND-1	His96	His98	His159	Asp100	Cys178	His220
Sous classe B2						
Consensus BBL	Asn116	His118	His196	Asp120	Cys221	His263
CphA	Asn69	His71	His148	Asp73	Cys167	His205
Sfh-1	Asn72	His74	His151	Asp76	Cys170	His212
Sous classe B3						
	His/Gln11					
Consensus BBL	6	His118	His196	Asp120	His121	His263
L1	His84	His86	His160	Asp88	Cys89	His225
FEZ-1	His71	His73	His149	Asp75	Cys76	His215
GOB-1	Gln80	His82	His157	Asp84	Cys85	His213
THIN-B	His105	His107	His185	Asp109	Cys110	His253

*BBL : Beta-Lactamase classe B

1.5. Mécanisme d'action

Comme mentionné ci-dessus, MBLs utilisent au moins une mais généralement deux ions de Zn²⁺ dans leur emplacement actif de catalyser l'hydrolyse de β -lactam. à reformuler (Viswanatha et al, 2008) On propose deux mécanismes pour MBLs basé sur le mono-zinc et les ions de Di-zinc. (Badarau, 2008, John Wiley & Sons, 2006)

dans le mécanisme de mono-zinc, la formation de l'hydroxyde nucleophile est facilitée avec l'interaction du résidu Asp120 et de l'ion de Zn²⁺ (Badarau, 2008, John Wiley & Sons, 2006) Le groupe d'hydroxyde attaque le carbone carbonyle électrophile pour former l'intermédiaire tétraédrique. (Badarau, 2008, John Wiley & Sons, 2006) En conclusion, protonation de l'azote intermédiaire tétraédrique par les résultats Asp120 de résidus dans C-N clivage de la liaison et la désactivation de la pénicilline (Figure. 7). (Badarau, 2008, John Wiley & Sons, 2006)

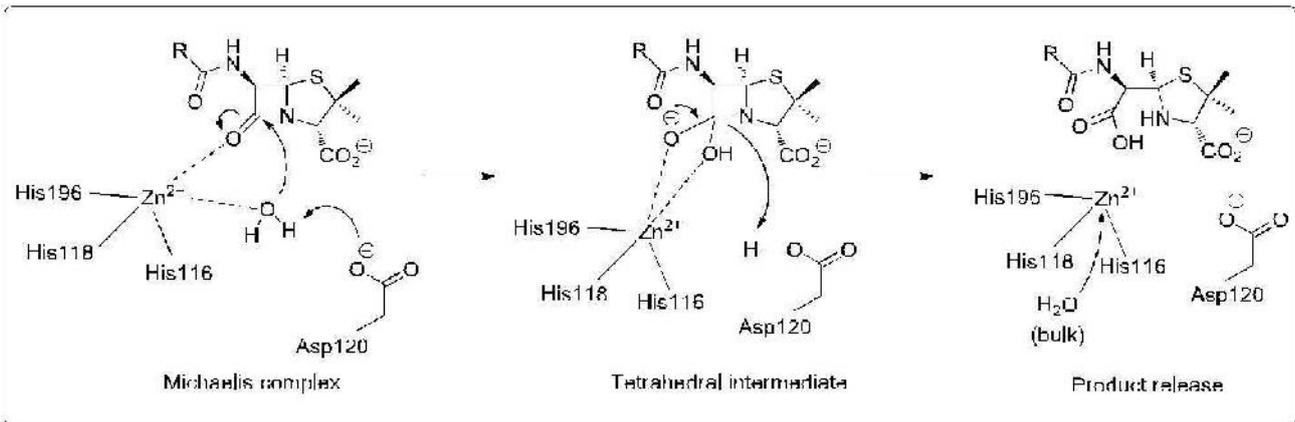


Figure. 7: Le mécanisme catalytique proposé de mono-zinc pour MBLs avec la pénicilline. (Badarau, 2008, John Wiley & Sons, 2006)

Le mécanisme catalytique du Di-zinc MBLs est légèrement différent. Dans ce mécanisme, l'ion hydroxyde pontant qui est liée entre les deux ions Zn^{2+} est le nucléophile attaquant l'ion d'hydroxyde traversier qui est lié entre les deux ions de Zn^{2+} est l'attaque nucleophile. (A. Badarau, 2008, John Wiley & Sons, 2006) (Badarau, 2008, John Wiley & Sons, 2006) comme d'habitude, la formation de l'intermédiaire tétraédrique est nécessaire de l'attaque d'hydroxyle sur le groupe carbonyle (Badarau, 2008, John Wiley & Sons, 2006) contrairement au mécanisme de mono-zinc, au lieu du résidu Asp120, la molécule d'eau apicale parfaitement placée qui est liée à $Zn2$ donne un proton à partir d'azote. [43, 48] L'eau apicale déprotonée émigre alors à $Zn1$ pour régénérer le groupe traversier d'hydroxyde (**Figure.8**) (Badarau, 2008, John Wiley & Sons, 2006)

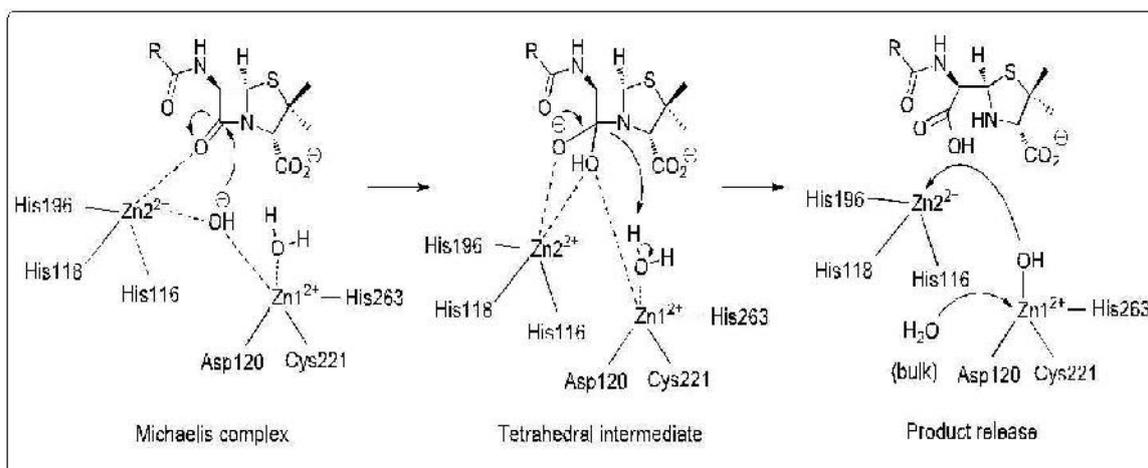


Figure. 8: Le mécanisme catalytique proposé de Di-zinc pour MBLs avec de la pénicilline.(A. Badarau, 2008, John Wiley & Sons, 2006)

1-6. Epidémiologie

L'intérêt accru aux métallo-beta-lactamases n'est pas accompagné des données épidémiologiques robustes parce que l'identification moléculaire des métallo-beta-lactamases n'a pas souvent été faite en études de grandes échelles. Cependant, la distribution de souches productrices de ce type d'enzyme est large et inquiétante car elle touche des pays des cinq continents (**Figure. 9**). Nous signalons que les zones qui apparaissent dans la figure comme étant dépourvue de souches productrices de MBL ne signifient pas qu'elles sont à l'abri de cette épidémie. En fait, elles manquent tout simplement d'études de dépistage (Cornaglia *et al.*, 2011).

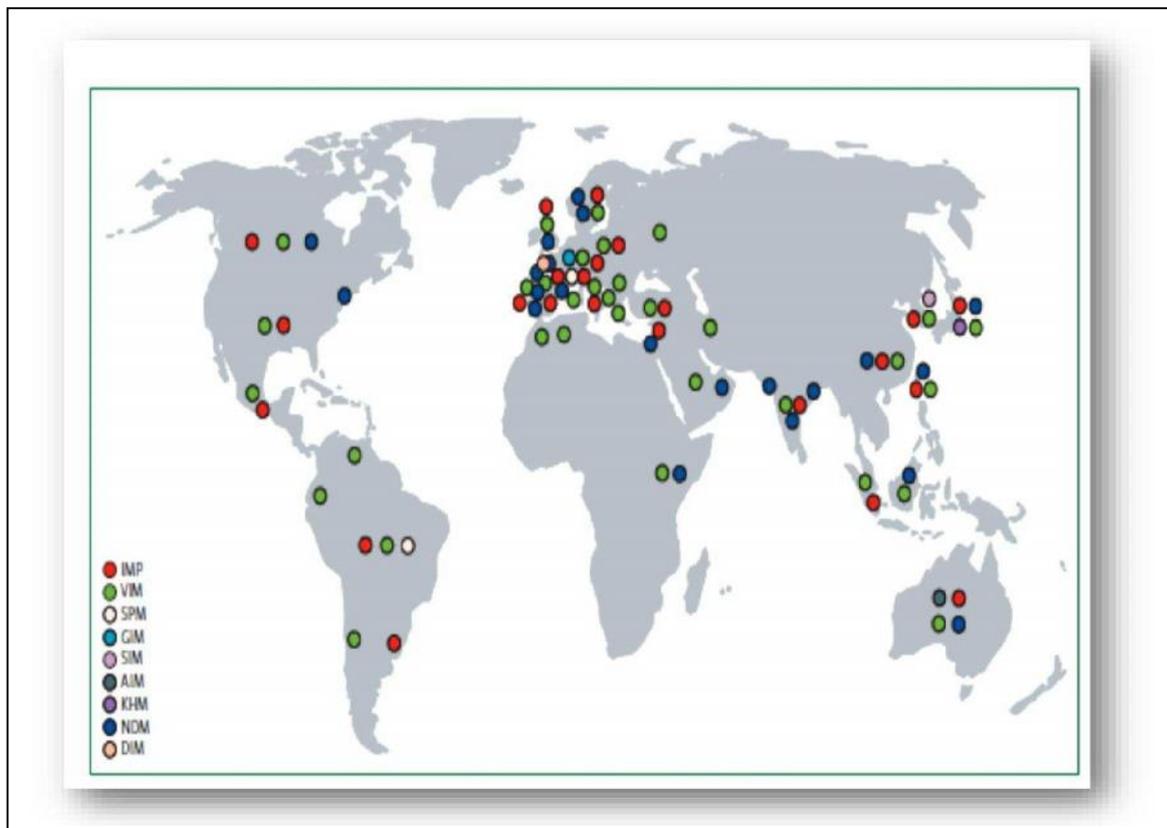


Figure. 9: Epidémiologie mondiale des MBLs (Cornaglia *et al.*, 2011).

Chapitre 2

Les Inhibiteurs de métallo- bêta-lactamases

Pour surmonter les effets de MBLs, une stratégie potentielle est utilisée il s'agit de la co-administration des inhibiteurs de MBL avec les antibiotiques β -lactames. Les inhibiteurs empêchent l'enzyme de MBL à lier aux antibiotiques de β -lactame et empêchent par la suite la dégradation et la désactivation des antibiotiques.

Tous les inhibiteurs ou les inactivateurs connus de la sérine β -lactamases sont inefficaces vis-à-vis les metallo- β -lactamases. Les inactivateurs rapportés de tout les metallo- β -lactamases sont l'EDTA comme chélateurs des métaux, les o-1, la phénanthroline 10 et l'acide dipicolinique, et toutefois ceux-ci n'ont aucune signification clinique.

II -1 -Inhibiteurs de Dicarboxylate

Les composés de dicarboxylate sont les deuxièmes inhibiteurs communs des enzymes de MBL.(Walter, L.D. Sutton,2013) Quelques inhibiteurs de carboxylate sont rapportés avec les valeurs IC50 aussi basses que 0.003 μ M(Walter, L.D. Sutton,2013)

Hiraiwa et autres ont synthétisé quelques dérivés d'acide phtalique qui sont efficace contre IMP-1(Hiraiwaet *al.*,2009)Ces composés ont montré que le bon effet inhibiteur contre IMP-1 et le dérivé acide phtalique benzylique (32) qu'a montré la valeur IC50 la plus basse parmi des inhibiteurs avec 0.968 μ M (**Figure. 10**).(Hiraiwaet *al.*,2009)

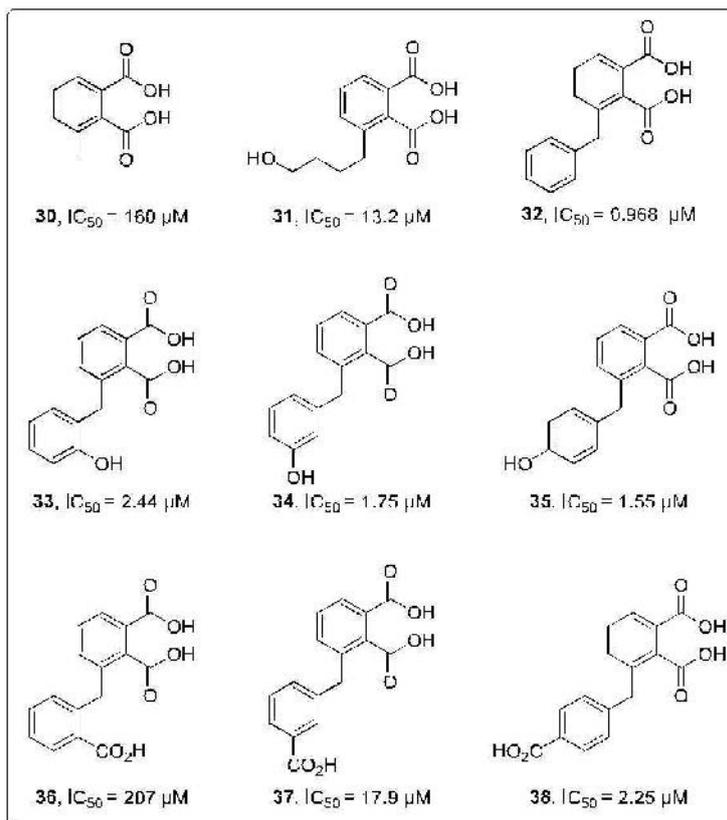


Figure. 10: Inhibiteurs d'acide phtalique contre IMP-1. (Hiraiwaet *al.*,2009)

Les mêmes auteurs ont également rapporté qu'encre plus de quatre ont substitué les dérivés acides phtaliques, mais les valeurs IC_{50} n'étaient pas aussi bonnes que les inhibiteurs précédents, s'étendant de 16 au μM 300 (**Figure. 11**) (Hiraiwaet *al.*,2009)

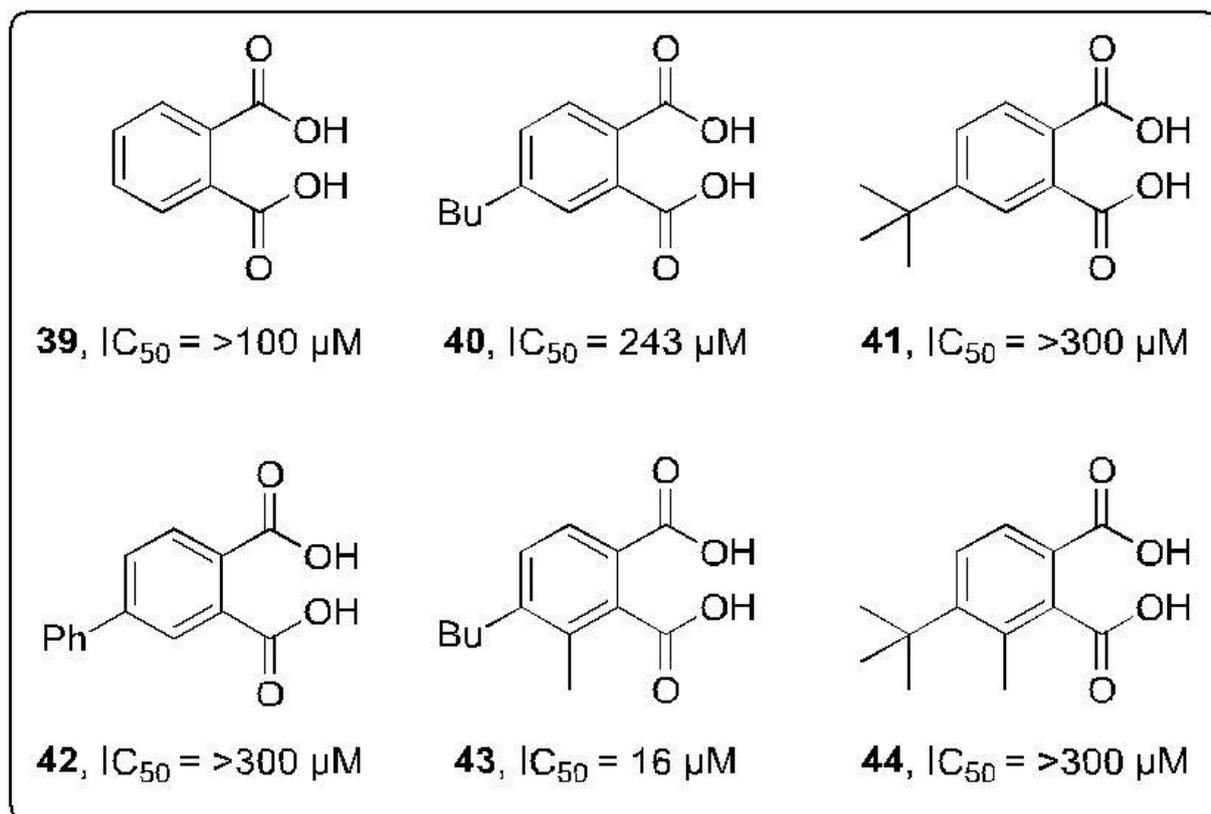


Figure. 11: L'activité IMP-1 inhibitrice de 4 a substitué les dérivés acides phtaliques. (Hiraiwa *et al.*, 2009) J.G. Moloughney

En 2004, Moloughney et autres (Moloughney *et al.*, 2005) ont rapporté quelques inhibiteurs de dicarboxylate contre IMP-1. Le plus efficace a la valeur de K_i du μM 3.3. La **Figure. 12** montre trois les plus efficaces de ces inhibiteurs. (Moloughney *et al.*, 2005)

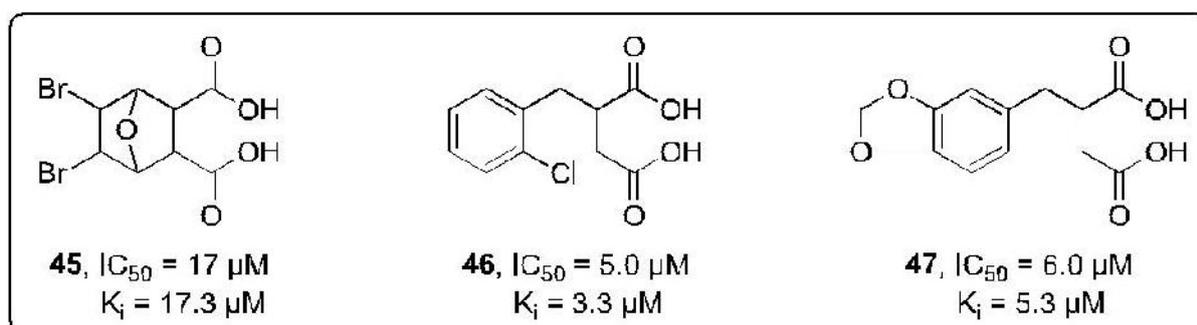


Figure. 12 Trois inhibiteurs efficaces de dicarboxylate contre l'enzyme IMP-1 (Moloughney *et al.*, 2005). (Toney *et al.*, 2001)

Les inhibiteurs les plus efficaces contre IMP-1 ont été rapportés par Toney et autres .(Toney *et al.*,2001) en 2001. Cette équipe de recherche a identifié un certain nombre de composés de dicarboxylate et les a analysés contre l'enzyme IMP-1 .(Toney *et al.*,2001)Ils ont identifié l'acide succinique (48) avec $IC_{50} = 6,3 \text{ mM}$ est pas un bon inhibiteur de la IMP-1 alors que les (2S, 3S) d'acide succinique-substitués étaient des inhibiteurs très puissants Ils ont identifié l'acide succinique (48) avec $IC_{50}=6.3 \text{ millimètre}$ n'est pas un bon inhibiteur contre IMP-1 alors que les (2S, 3S) d'acide succinique-substitués étaient les inhibiteurs très efficaces. Quatre composés (51-54) ont montré IC_{50} entre 2.7 nanomètre et 13 nanomètre (le schéma 1-41). (Toney *et al.*,2001) Les 2.2 ont disubstitué les acides succiniques (49-50) n'étaient pas les inhibiteurs IMP-1 efficaces. Parmi toutes les différentes catégories des inhibiteurs IMP-1, le composé 51 a été identifié comme inhibiteur le plus efficace avec le plus bas $IC_{50}=2.7 \text{ nanomètre}$ (**Figure. 13**)(Toney *et al.*, 2001)

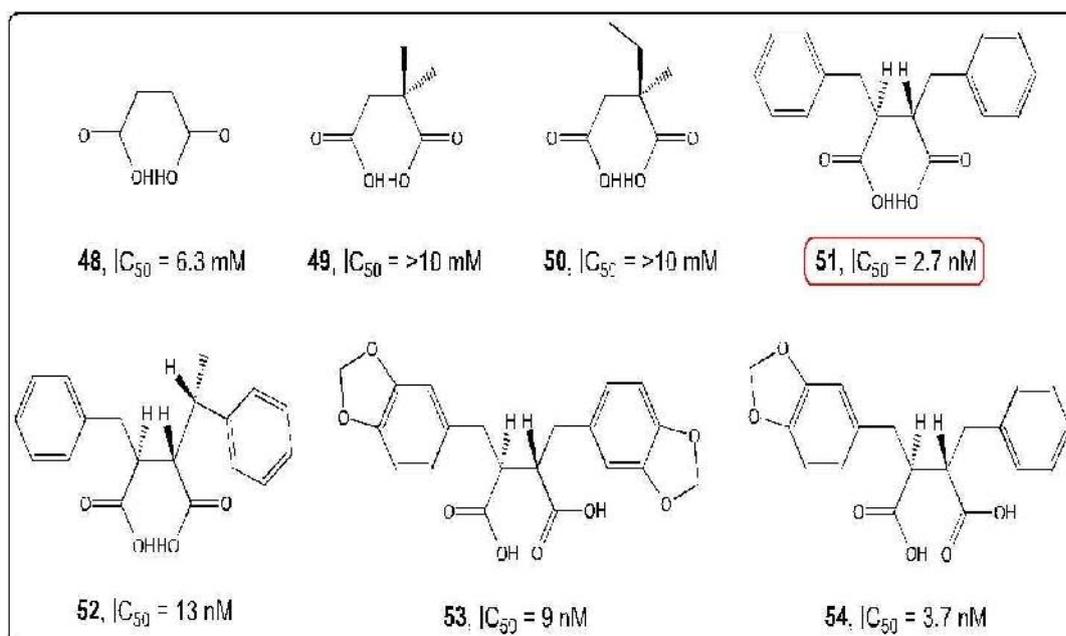


Figure. 13: Inhibiteurs de Dicarboxylate contre IMP-1. (Toney *et al.*,2001)

La structure cristalline du composé 53 co-cristallisé avec IMP-1 (PDB=1JJT) a été également rapportée par Toney et autres (le schéma 1-42). (Toney *et al.*,2001)(**Figure. 14**)montreune des carboxylates est coordonné à Zn1 (2.13 Å) et à Zn2 (2.05 Å) tandis que l'autre carboxylate est coordonné seulement à Zn2 (2.49 Å). En outre, les carboxylates forment des liaisons hydrogène avec les résidus Gly232 et Asn233 d'acide aminé.(Toney *et al.*, 2001).

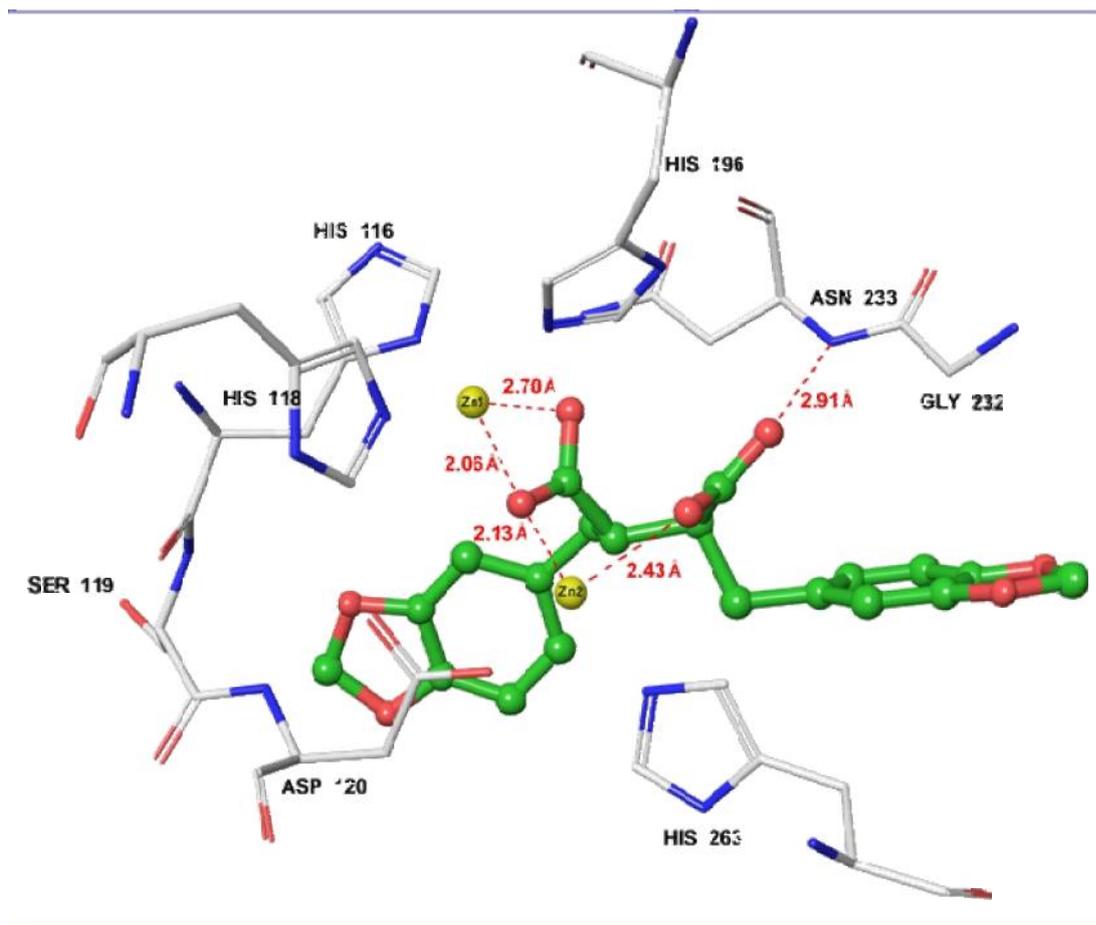


Figure.14 La structure cristalline d'IMP-1 Co-cristallized avec l'inhibiteur efficace 53 (APB = 1JJT). (Toney *et al.*, 2001)

II -3- Inhibiteurs de cétone et d'alcool de Trifluorométhyl

En 1996, Walter et autres (Walter *et al.*, 1996) a rapporté des dérivés de cétone et d'alcool de trifluorométhyl comme inhibiteurs contre MBLs (**Figure. 15**). Ces composés ont été analysés contre différentes sous-classes de MBL et les valeurs de K_i mesurées par rapport à BcII (sous-classe B1), à VIM-2 (sous-classe B1), à CphA (sous-classe B2) et à L1 (sous-classe B3) étaient aussi basses que le $1.5 \mu\text{M}$. (Walter *et al.*, 1996) L'atome d'oxygène du groupe de cétone de trifluorométhyl de ces inhibiteurs a été présumé pour lier à l'emplacement actif de l'ion de zinc sous sa forme d'hydrate (les analogues non-fluorés étaient inactifs). (Walter *et al.*, 1996) En outre, la liaison de ces composés à CphA s'est avéré irréversible, indiquant un mécanisme différent de l'inhibition de ces composés pour MBLs différent. (Walter *et al.*, 1996)

(Le **tableau 2**) montre des valeurs de K_i de ces inhibiteurs contre trois MBLs.

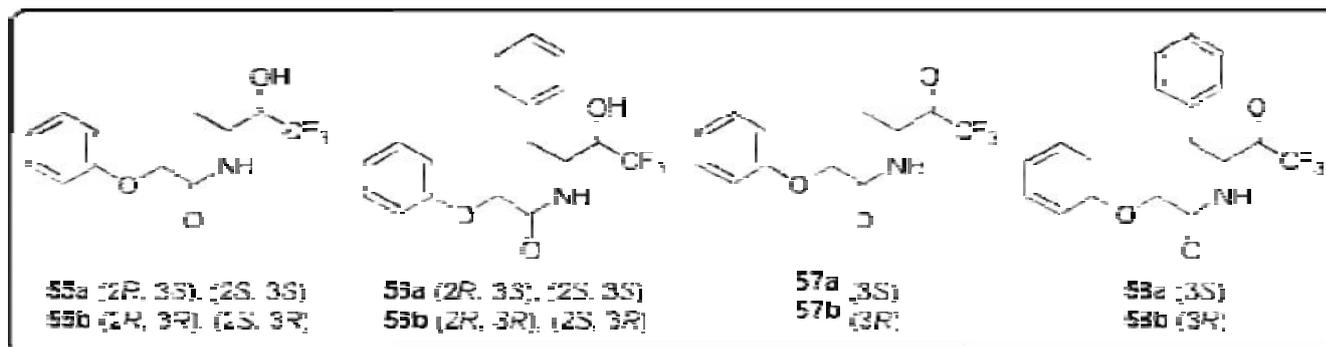


Figure. 15: Cétones de Trifluorométhyl et inhibiteurs d'alcools contre métallo-β-lactamases. (Walter *et al.*, 1996)

Compound	B1*		B3
	BcII	IMP-1	L1
55a (2 <i>R</i> , 3 <i>S</i>); (2 <i>S</i> , 3 <i>S</i>)	300	400	>5000
55b (2 <i>R</i> , 3 <i>R</i>); (2 <i>S</i> , 3 <i>R</i>)	700	400	35 ± 2
57a (3 <i>S</i>)	300	300	1.5±0.01
57b (3 <i>R</i>)	700	500	3.0 ± 0.4
56a (2 <i>R</i> , 3 <i>S</i>); (2 <i>S</i> , 3 <i>S</i>)	1000	900	>5000
56b (2 <i>R</i> , 3 <i>R</i>); (2 <i>S</i> , 3 <i>R</i>)	30	60	>5000
58a (3 <i>S</i>)	500	530	15±1
58b (3 <i>R</i>)	1000	Not tested	Not tested

Tableau 2 : Valeurs de K_i (dans le μM) contre trois MBLs (sous-classes B1 et B3).

(Walter *et al.*, 1996)

* L'auteur n'a rapporté aucune erreur pour l'analyse cinétique de thèse

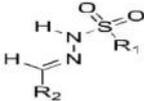
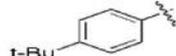
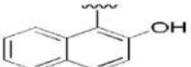
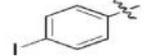
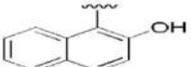
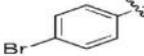
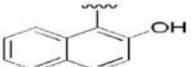
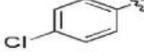
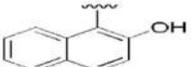
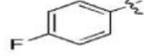
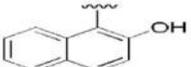
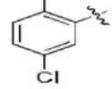
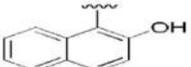
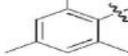
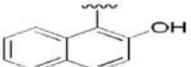
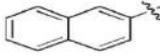
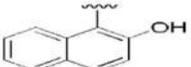
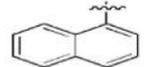
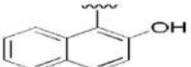
II -4- inhibiteur de sulfonamide

Les sulfonamides sont une autre classe commune des inhibiteurs de MBL. Un certain nombre d'hydrazones sulfonyles ont été examinées contre IMP-1 par Siemann et autres (Siemann *et al.*,2002) pour certains de ces composés que les valeurs d'IC₅₀ se sont étendus de 2 au μM 150 (**Tableau.3**). Les composés ayant un groupe anthracényle a montré la plus basse IC₅₀. Parmi tous les composés, 59c composé a montré l'inhibition maximum avec la valeur IC₅₀ du μM 2.2.

L'étude d'accostage du composé 59c avec une valeur IC₅₀ de 2,2 μM prédit que l'un des atomes d'oxygène de cet inhibiteur, lié au zinc dans le site actif de l'oxygène tandis que l'autre fait une liaison hydrogène, avec Asp 167. Aucune structure cristalline a été rapportée pour l'enzyme l'en avec ces molécules liées

L'étude d'amarrage de 59c composé avec IC₅₀ le μM de la valeur 2.2 a prévu celui-là des atomes d'oxygène de cet inhibiteur métallisé sur le zinc dans l'emplacement actif tandis que l'autre oxygène faisait une liaison hydrogène avec Asp167. Aucune structure cristalline n'a été rapportée pour l'enzyme avec ces molécules métallisées dans l'emplacement actif.

Tableau.3: Activité inhibitrice de divers 2 hydroxynaphthyl, de 2 methoxynaphthyl et de dérivés d'anthracenyl contre IMP-1. (Siemannet *al.*,2002)

Compound		R ₁	IC ₅₀ (μM)		
			R ₂ =	(a)	(b)
59		16		3,8	2,2
60		17,5		6,3	3,0
61		25		13	4,6
62		55		19	7,0
63		150		55	13,5
64		40		10	4,5
65		10		4,8	1,6
66		10		4,0	1,6
67		20		6,2	2,4

Chapitre 3

Plante étudiée

III. Plante étudiée : *Phoenix dactylifera*

Présentation de la plante :

Le dattier, *Phoenix dactylifera* L. (Arecaceae), est un palmier subtropical anciennement domestiqué (MUNIER, 1973). Il est largement cultivé pour ses multiples usages et ses services éco systémiques, en particulier pour ses fruits comestibles dont des milliers de variétés ont été sélectionnées (BOUGUEDOURA, 1979) et pour sa capacité d'adaptation aux conditions des climats arides les plus sévères (BEN AÏSSA, 2008). Sa présence crée un microclimat permettant le développement de diverses formes de vie animale et végétale indispensables pour le maintien et la survie des populations du désert (EL HOUMAIZI 2002). Le palmier dattier avec le cocotier est abondamment cultivé, mais non naturalisé (PERRIER DE LA BATHIE, 1933).

Le dattier a été nommé « *Phoenix dactylifera* L. » par Linné en 1753. *Phoenix* dérivé de Phoïnix est le nom du dattier chez les Grecs antiques qui l'ont considéré comme l'arbre des Phéniciens (du grec « phoen » rouge sang, caractéristique de la couleur de leur peau) ou Phéniciens. « *Dactylifera* » vient du latin « *dactylus* » dérivant du grec « *daktylos* » signifiant doigt en raison de la forme de fruit du dattier. (BOUNA, 2002).

C'est une plante utile certainement introduite non pas par les courants marins comme son habitat côtier le fait croire, mais par des migrants d'origine africaine qui ont peuplé à une date très ancienne à Madagascar. Elle aurait été introduite sur les côtes orientales de l'Afrique par les Arabes avant le XVe siècle aux îles de Comores et à Madagascar au XVIIe siècle (PERRIER DE LA BATHIE, 1933). Le dattier cultivé est connu depuis la plus haute antiquité bien que les aires de répartition primitive sont le Sud-ouest asiatique et l'Amérique du Nord-est (CATY, 1929).

La datte, fruit du palmier dattier, est une baie de forme allongée, oblongue ou arrondie. Elle est composée d'un noyau, ayant une consistance dure, entouré de chair (**Figure. 16**).

- La partie comestible dite chair ou pulpe est constituée de :

-Un mésocarpe généralement charnu, de consistance variable selon sa teneur en sucre et de couleur soutenue

-Un endocarpe de teinte plus clair et de texture fibreuse, parfois réduit à une membrane parcheminée entourant le noyau. (Espiard, 2002).

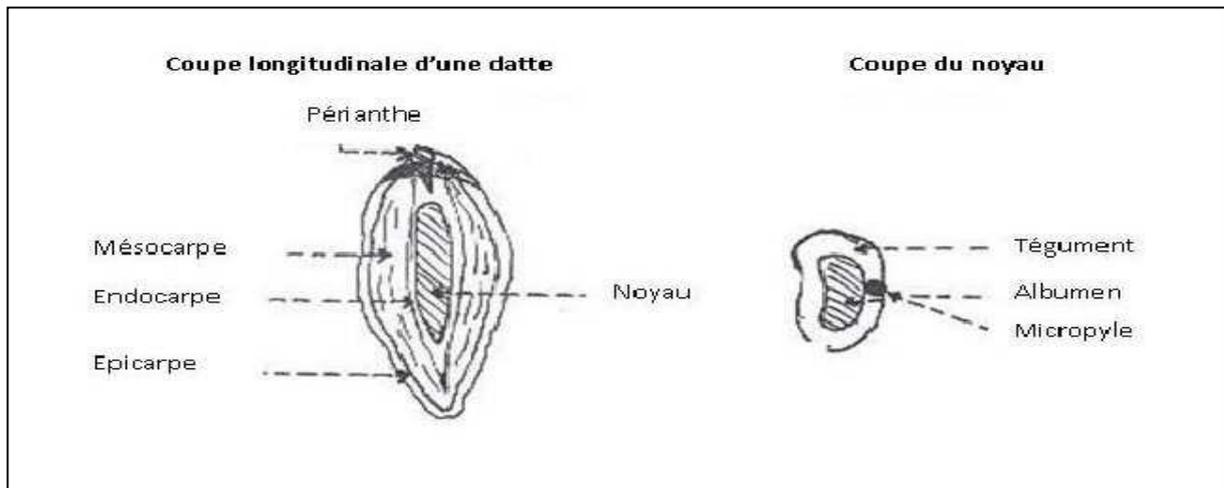


Figure. 16: Datte et noyau du palmier dattier d'après (Belguedj, 2001).

Les dimensions de la datte sont très variables, de 2 à 8cm de longueur et d'un poids de 2 à 8 grammes selon les variétés. Sa couleur va de blanc jaunâtre au noir passant par les couleurs ambre, rouges, brunes plus en moins foncées (Djerbi, 1994).

Position systématique

La plante *Phoenix dactylifera* est représentée par 200 genres et 2700 espèces réparties en six sous-familles. La sous famille des Coryphoidées est elle-même subdivisée en trois tribus (Riedacker et al., 1990).

La classification botanique du palmier dattier donnée par Djerbi, (1994) est la suivante:

Groupe : Spadiciflores

Embranchement : Angiospermes

Classe : Monocotylédones ;

Ordre : Palmale ;

Famille : Palmacées ;

Sous famille : Coryphoidées ;

Tribu : Phoenicées ;

Genre : *Phoenix* ;

Espèce : dactyliféra L.

Composition biochimique

III.3. 1 Composition biochimique de la partie comestible "Pulpe

La datte est constituée de deux parties, une qui est comestible, représentée par la pulpe(mésocarpe) ; et l'autre, non comestible, qui est le noyau, ayant une consistance dure. Ce dernier représente 10 à 30% du poids de la datte, il est constitué d'un albumen protégé par une enveloppe cellulosique. Selon Estanove (1990), la datte se compose essentiellement d'eau, de sucres réducteurs « glucose et fructose » et de sucres non réducteurs, « saccharose ». Les constituants non glucidiques représentent les protides, les lipides,, les cendres (sels minéraux), les vitamines et les enzymes.

III.3.1.1. Constituants majeurs

III 1.1.1. L'eau

La teneur en eau est en fonction des variétés, du stade de maturation et du climat(**Tab 4**). Elle varie entre 8 et 30 % du poids de la chair fraîche avec une moyenne d'environ 19 %(Noui, 2007).

Tableau 4: Teneur en eau de quelques variétés de dattes de la régionFliache (Biskra), en % d'après (Noui, 2007)

Variété	consistance	Teneur en eau
Deglet-Nour	Demi-molle	22.60
Mech-Degla	Sèche	13.70
Ghars	Molle	25.40

III 1.1.2. Les sucres :

Les sucres sont les constituants majeurs de la datte. L'analyse des sucres de la datte a révélé essentiellement trois types : saccharose, fructose et glucose (Estanove, 1990; Acourene et Tama, 1997). Ceci n'exclut pas la présence d'autres sucres en faible proportion tels que : le galactose, le xylose et le sorbitol (Favier et al., 1993; Siboukeur, 1997). La teneur en sucres totaux est très variable, elle dépend de la variété et du climat. Elle varie entre 70 et 90 % du poids de la matière sèche (**Tab 5**) (Belguedj, 2001).

Tableau 5 : Teneur en sucres de quelques variétés algériennes d'après (Belguedj, 2001)

Constituant par rapport à la matière sèche %	Dattemolle (Ghars)	Datte demi-molle (Deglet-Nour)	Dattesèche (Mech-Degla)
Sucre totaux	85.28	71.37	80.07
saccharose	80.68	22.81	20.00
Sucre réducteur	04.37	46.11	51.40

III 1.1.3. Protéines et acides aminés

La pulpe de la datte ne contient qu'une faible quantité de protéines. Le taux diffère selon les variétés et surtout selon le stade de maturité, il est en général de l'ordre de 1.75% du poids de pulpe. Aussi, il a été montré que le pourcentage de protéines présent dans les noyaux des dattes plus important que celui de la pulpe (Abou-Zeid et al., 1991). Selon Al-Shahib et Marshall (2003), les protéines de la datte contiennent 23 acides aminés (**Tableau 6**) dont certains ne sont pas présents dans certains fruits comme la banane, la pomme et l'orange.

Tableau 6: Composition moyenne en acides aminés de la datte sèche (Favier et al., 1993).

Acidesamines	Teneur de la pulpe, en mg/100 g
Isoleucine	64
Leucine	103
Lysine	72
Méthionine	25
Cystéine	51
Phénylalanine	70
Tyrosine	26
Thréonine	69
Tryptophane	66
Valine	88
Arginine	68
Histidine	36
Alanine	130
Acideaspartique	174
Acideglutamique	258
Glycocolle	130
Proline	144
Sérine	88

III 1.1.4. Les fibres :

La datte est riche en fibres, elle en apporte 8.1 à 12.7 % du poids sec, (Al-Shahib et Marshall, 2002). Selon Benchabane (1996), les constituants pariétaux de la datte sont : la pectine, la cellulose, l'hémicellulose et la lignine. Les dattes fines, comme la Deglet-Nour, ne contiennent qu'une faible proportion en cette substance, mais des proportions plus élevées atteignant parfois plus de 10 % dans le cas des dattes communes particulièrement fibreuses (Munier, 1973).

III 1.1.5. Les acides gras :

La datte renferme une faible quantité de lipides. Leur taux varie entre 0,43 et 1,9 % du poids frais (Djouab, 2007). Cette teneur est en fonction de la variété et du stade de maturation. Yahiaoui (1998) a étudié la composition en acides gras qui se trouvent dans la variété DegletNour, celle-ci est comprise entre 7 et 13% (**Tab 7**).

Tableau 7:Composition en acides gras de la dattes Deglet-Nour, en % de matière grasse d'après (Yahiaoui, 1998)

Acidesgras	Teneur en% de matière grasse
Acidelinolénique (C18 : 3)	12.30
Acidelinoléique (C18 : 2)	11.47
Acideoléique (C18 :1)	10.74
Acidestéarique (C18 : 0)	10.47
Acidepalmitique (C16 : 0)	7.89
Acidemyristique (C14 : 0)	8.66

III 1.1. 6. Les minéraux :

La caractéristique la plus remarquable des dattes réside dans la présence de minéraux et d'oligoéléments particulièrement abondants dépassant nettement les autres fruits secs (Devshony et al., 1992)(.Tableau8)

Tableau8 : La composition minérale de la dattes sèche (Devshony et al., 1992)

Eléments minéraux	Pour 100g de dattes sèche
Sodium	0.017
Potassium	0.3
Magnésium	0.036
Phosphore	0.07
Calcium	0.1
Fer	0.016

III 1.1. 7. Les vitamines

La pulpe de dattes contient des vitamines en quantités variables avec les types de dattes et leur provenance. En général, elle contient des caroténoïdes et des vitamines du groupe B en quantités appréciables, mais peu de vitamine C(**Tableau9**) (Munier, 1973).

Tableau9: Teneur en minéraux et vitamines pour 100 g de pulpe d'après (Benchelah et Maka, 2008).

Vitamines (mg)	
B3	1.7
B5	0.8
B2	0.10
B6	1.15
PP	0.03
Vitamine C	présente en faible quantité
Folates (B9)	28,00 . 10-

III 1.1.8. Polyphénols :

La datte renferme des métabolites secondaires dits composés phénoliques. L'analyse qualitative des composés phénoliques de la datte a révélée la présence des acides cinnamiques, des flavones, des flavanones et des flavonols (Mansouri et al., 2005). Selon Henk et al., (2003), les polyphénols jouent un rôle important dans le corps : ils ont des effets anti-inflammatoires, antioxydants, abaissent la tension artérielle et renforcent le système immunitaire.....etc

III 1.1.8 ,1 **Tanins**

Ils constituent plus de 3% du poids de la datte; l'un des principaux effets de ces derniers intervient lors du processus de maturation par la variation de leur solubilité (texture) : ils passent de la forme soluble (astringente) à la forme insoluble(insipide), résultant probablement de leur combinaison avec les protéines (variation du goût).(Barreveld1993)

Les tanins jouent également un rôle dans le brunissement non enzymatique (Maier et al1964), c'est pourquoi, des traitements thermiques sont réalisés afin de retarder le phénomène de brunissement lors du stockage des dattes. (Maier et al1964),

Procyanidines sont les tannins condensés et les précurseurs principaux de colorants bleu-violet et rouges dans les fruits, les légumes, les écrous, les graines, les fleurs, et les écorces (fines, 2000). Suivre la méthode acide acétone-eau-acétique d'extraction par solvants, Hong et autres (2006) a extrait des procyanidins à partir de la variété de Deglet Noor de dates

dans l'étape de Khalal de la maturité. L'analyse chimique suggère que le procyanidine ait existé en tant que des polymères plus supérieurs de poids moléculaire, des undecamers par desheptadecamers, et decamers (Hong et autres, 2006) (**Figure.17**).

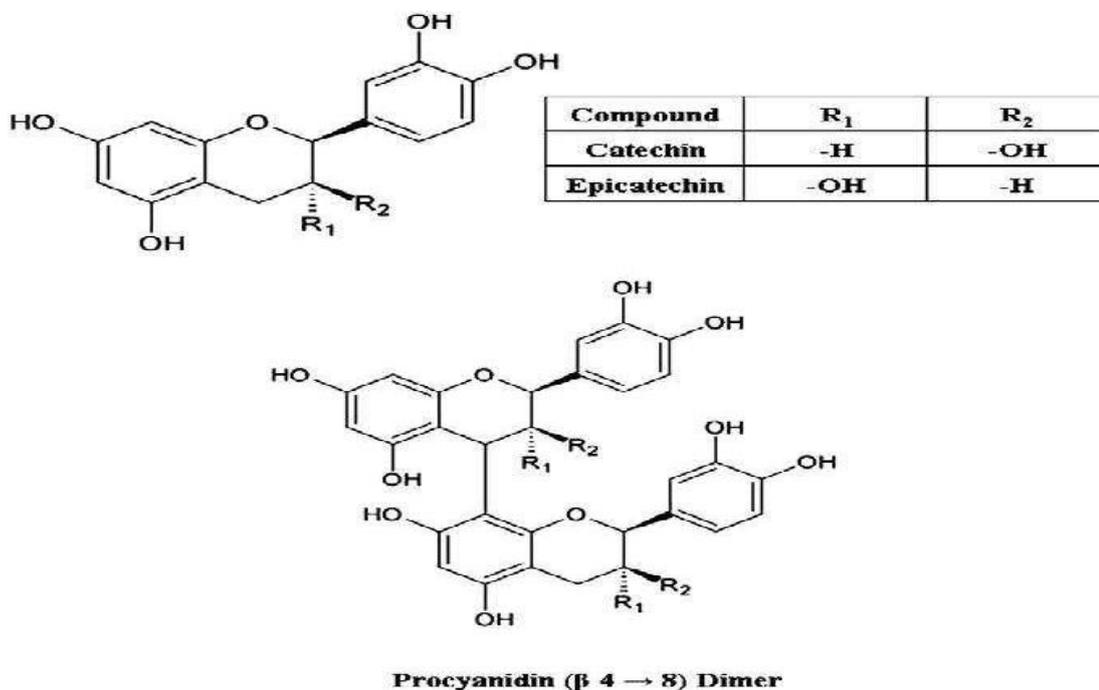


Figure.17. structures des procyanidines actuels dans les dates.

III 1.1.8 ,2 Flavones

Ces composés sont essentiellement impliqués dans le phénomène de brunissement enzymatique qui est responsable de la coloration de la date au cours de la maturation (Barrevel, 1993 ; Cheftel et al., 1977). Hong et autres (2006) a évalué le contenu flavonoïde dans la variété de Deglet Noor pendant l'étape de Khalal de la maturité et a identifié treize glycosides flavonoïdes de lutéoline, de quercétine, et d'apigénine (**Figure.18**). On a également observé que les deux formes méthylées et sulfatées de la lutéoline et la quercétine sont présentes sous forme de mono de Di- et tri glycosylée. Il les conjugués a été également observé que les formes méthylées et sulfatées de lutéoline et de quercétine sont présentes comme mono, de Di, et triglycosylated tandis que l'apigénine est présent seulement comme diglycoside. La quercétine et la lutéoline ont formé principalement les tringeries O-glycosidiques tandis que l'apigénine était présent comme C-glycoside. En date d'aujourd'hui, les dates ont également la distinction unique d'être la seule nourriture pour contenir les sulfates flavonoïdes (Hong et autres, 2006).

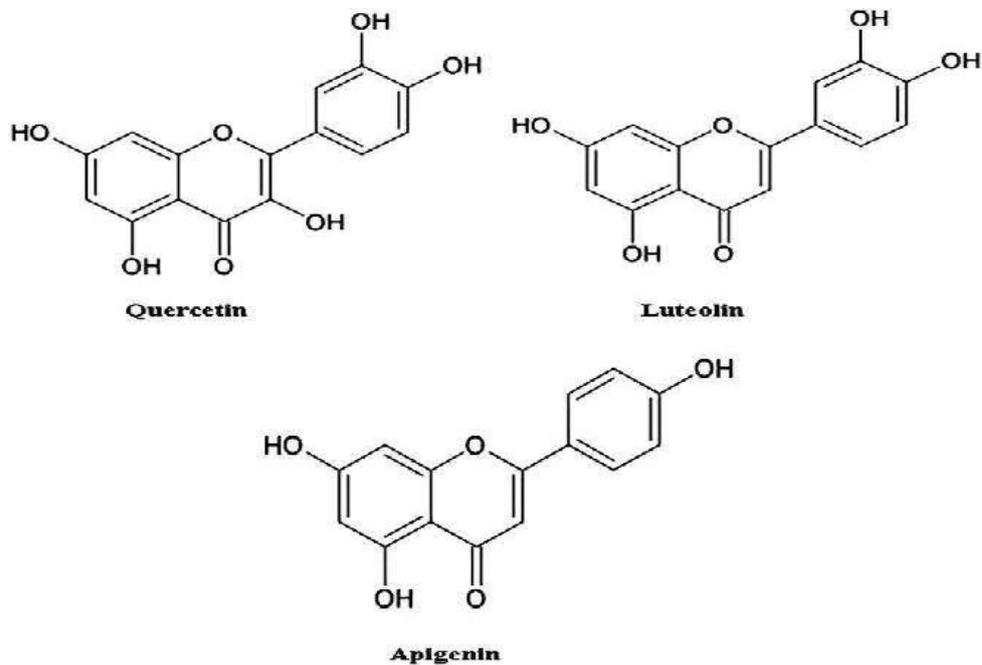


Fig. 5. structures des flavanoïdes actuelles dans les dates.

III 1.1.9. Les enzymes

Les enzymes jouent un rôle important dans le processus de conversion se produisant pendant le stade de formation et la maturation du fruit. La qualité de la datte est influencée par l'activité de :

- . **L'invertase** : Responsable de l'inversion du saccharose en fructose et glucose.
 - . **La cellulase** : Elle décompose la cellulose en chaînes plus courtes.
 - . **La pectinmethylesterase** : Elle convertit les substances pectiques insolubles en pectine plus soluble qui ramollit le fruit.
- La polyphenoloxydase** : Elle conduit au brunissement du fruit suite à l'oxydation des phénols (Yahiaoui, 1998).

III 1.2. Constituants mineurs

Bien que 95% des constituants sont cités ci-dessus, il existe d'autres composés sous forme de traces tels que :

III 1.2.1 Les acides organiques

Le jus de datte est légèrement acide. Rygg (1948, 1953), rapporte que les dattes mûres se caractérisent par une acidité moins importante avec un pH de 5, mais il ne se prononce pas formellement sur le rôle de l'acidité dans les dattes. Youssef et al., (1992) ont analysé deux variétés de dattes égyptiennes et ont montré l'existence de trois acides organiques : malate, citrate, et oxalate.

III 1.2.2 Les composés volatils (Flaveur)

Les composés volatils sont responsables de l'arôme spécifique. Ces composés aromatiques spécifiques aux dattes sont peu connus et n'ont pas fait l'objet de beaucoup de recherches. (Benchabane, 1996).

. III 1.2.3 Pigments

Les principaux pigments identifiés dans les dattes sont : caroténoïdes, anthocyanines flavones, flavonols, lycopènes, flavoxanthine et lutéine dans certaines variétés égyptiennes (**Tableau. 10**) (Ashmawi et al., 1955 cité par Barreveld, 1993).

Tableau. 10:Principaux pigments colorés se trouvant dans les dattes

Pigments		Couleur	Propriétés
Caroténoïdes	Lycopènes	Rouge	Précurseur des carotènes
	Carotènes	Orange	Précurseur de la vitamine A
	Lutéine	Jaune	
Flavonoïdes et dérivés	(Flavones (apigénine))		
	Flavonols (catéchine)	Jaune	
	Flavoxanthine	Jaune	Faiblement soluble dans l'eau
	Anthocyanines	Rouge en milieu acide Bleu en milieu basique	Indicateurs de pH

III.2 Composition biochimique de la partie non comestible "Noyau "

Le noyau présente 7 à 30 % du poids de la datte. Il est composé d'un albumen blanc, dur et corné protégé par une enveloppe cellulosique (Espiard, 2002). Les travaux de recherche menés sur la composition des noyaux de certaines variétés de dattes d'Arabie Saoudite ont démontré la présence de protéines, de glucides, de lipides, et de minéraux (K, P, Ca, Na, Fe, Mn, Zn, Cu). En plus des protéines, le noyau contient des acides gras tels que l'acide oléique, palmique, laurique, linoléique et palmitique mis en évidence dans l'huile extraite des graines (Al Houti et al., 1998).

Deuxième partie

Expérimentation

Matériel et méthodes

Le travail expérimental subdivisé en plusieurs étapes:

- Extractions
 - a) Extraction de flavonoïdes glycosides
 - b) Extraction des procyanidines

Notre travail vise à rechercher des micro-organismes et plus précisément les souches *P. aeruginosa* qui présentent un niveau élevé de résistance aux antibiotiques qui se trouvent dans le milieu hospitalier afin :

- D'évaluer le degré de contamination, d'identifier la souche bactérienne sa localisation et sa voie de transmission.
- Déterminer le mécanisme de résistance aux bêta-lactamines (mécanisme enzymatique)
- Tester notre extrait sur l'enzyme responsable à la résistance.

Ce travail a été réalisé aux différents lieux : laboratoire de Biologie au département de Biologie à l'Université de Saida et au niveau d'hôpital de Ghriss 'Dali Abdelkader'.

I. Matériel végétale :

.1.Description et choix de la variété :

I.1.1.Choix de la variété :

Le matériel utilisé dans cette étude est *Deglet-Nour*, il est très répandu dans les palmeraies du Sud-Est de l'Algérie et plus exactement à Tolga (Biskra). La datte *Deglet-Nour* a un goût parfumé, est de forme fuselée ou ovoïde. À maturité la datte est plutôt beige marron, l'épicarpe est lisse et brillant, le mésocarpe est très peu charnu de consistance demi-molle et de texture fibreuse.

Le choix de cette variété est justifié par sa qualité gustative, sa disponibilité sur le marché et sa large consommation (elle constitue 53,9% de la production nationale).

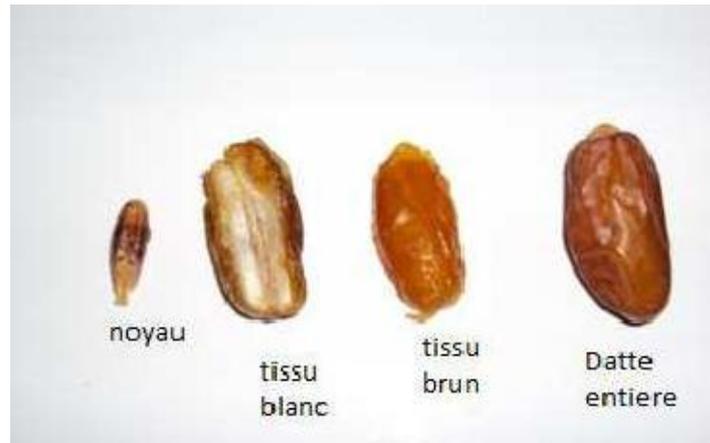


Figure 19: Photographie de la datte entière *Deglet-Nouret* ses deux tissus constitutifs

I.2 Matériel biologique :

I.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, lits des malades) et identifiées au niveau de laboratoire de département de Biologie; Faculté des Sciences, Université de SAIDA

II. Méthodes :

Préparation des extraits de dattes :

II.1.1 traitement des échantillons :

La datte étudiée est des palmeraies de la région la wilaya de Biskra. La méthode d'échantillonnage suivie est celle préconisée : Acourene et Tama (1997).

Récolte et séchage:

La variété *Deglet Nour* est à cause de sa faible teneur en eau, elle a été séchée à l'étuve à 40 °C après avoir été dénoyautée et découpée en morceaux en suite ont la réduite en poudre à l'aide d'un broyeur. Le procédé d'extraction est réalisé comme le montre La figure 20.

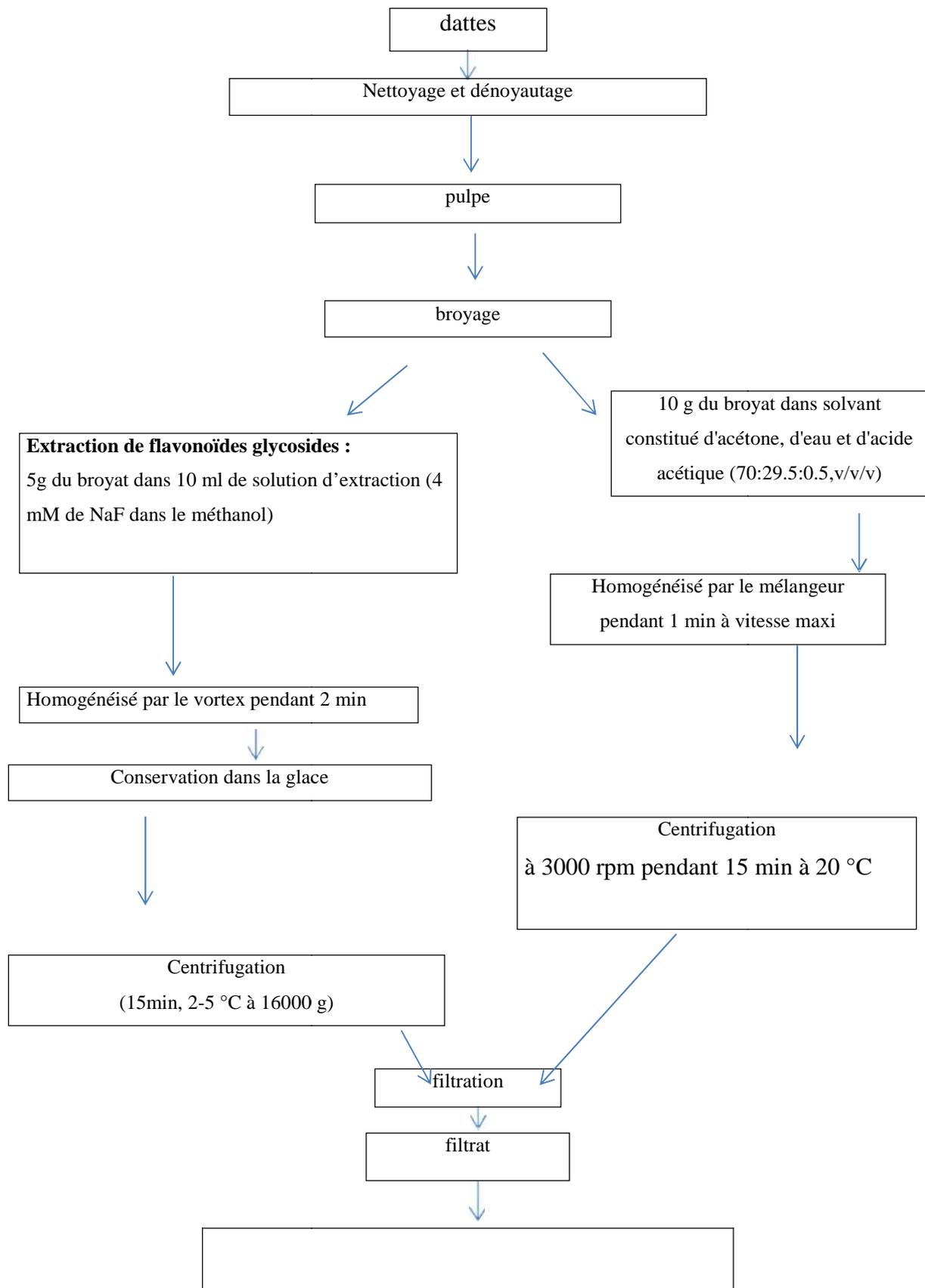
Extraction de flavonoïdes glycosides :

Plusieurs solvants organiques peuvent être utilisés pour l'extraction des composés phénoliques **Owen et Johns, (1999)**. Le méthanol pur est l'un des solvants qui donne le meilleur rendement d'extraction (**Diallo et al., 2004 ; Ribéreau-gayon, 1968**) .

Le fruit dénoyauté (5 g) a été homogénéisé par le vortex pendant 2 min (mettez le mélange sur la glace) avec 10 ml de solution d'extraction (4 mM de NaF dans le méthanol pour inactiver les polyphénole oxydases et de prévenir la dégradation phénolique due à un brunissement). Les homogénats ont été conservés dans la glace jusqu'à centrifugé (15 min, 2-5 ° C à 16000g). Le surnageant a été récupéré et filtré sur 0,45 filtres µm. Le filtrat a été évaporé par le Rotavap.

Extraction des procyanidines :

Les procyanidines ont été extraites à partir de dates dénoyautées en utilisant un solvant constitué d'acétone, d'eau et d'acide acétique (70:29.5:0.5, v/v/v). En bref, un échantillon de 10 g a été homogénéisé pendant 1 minute à vitesse maximale dans un mélangeur Waring en présence de 100 ml de solvant d'extraction. Les échantillons individuels ont été effectués en triple. Le mélange a été agité pendant 30 min à température ambiante pour permettre l'extraction complète du solvant. Les extraits ont été centrifugés à 3000 rpm pendant 15 min à 20 °C. Le surnageant a été filtré à travers un papier Whatman n°1. Après, le filtrat a été concentré dans un évaporateur rotatif (RotaVap) sous vide à 40 ° C. Les échantillons séchés sous forme de poudre ont été reconstitués dans de l'eau (20 ml).

Figure 20: principale étapes d'extraction de **dattes**

Isolement et identification des *Pseudomonas* :**Prélèvements**

Les différents prélèvements sont effectués (sondes ou écouvillons) sont mis dans un bouillon nutritif et acheminés au laboratoire pour être incubés à 37°C pendant 24 h.

Identification :**Les caractères cultureux (Examen macroscopique) :**

En général, les bacilles à Gram négatif non fermentaires croissent sur milieux simples comme la gélose Trypto-Caseine Soja (TSA) et la gélose lactosée de Drigalski à 30°C et souvent à 37°C, avec un temps d'incubation de 48 à 72 heures pour que les colonies soient repiquables. *Pseudomonas aeruginosa* élabore des pigments (la pyocyanine, pigment bleu-vert, est pathognomonique). Après ensemencement sur la gélose Mac Conkey et incubation à l'étuve à 37°C en 24 heures, *Pseudomonas aeruginosa* se présente comme suit : elle donne des colonies lactose négative, « œuf sur le plat » avec des pigments bleu-vert et possède une odeur caractéristique (acacia ou seringa). Le procédé d'identification est réalisé comme le montre la **figure**

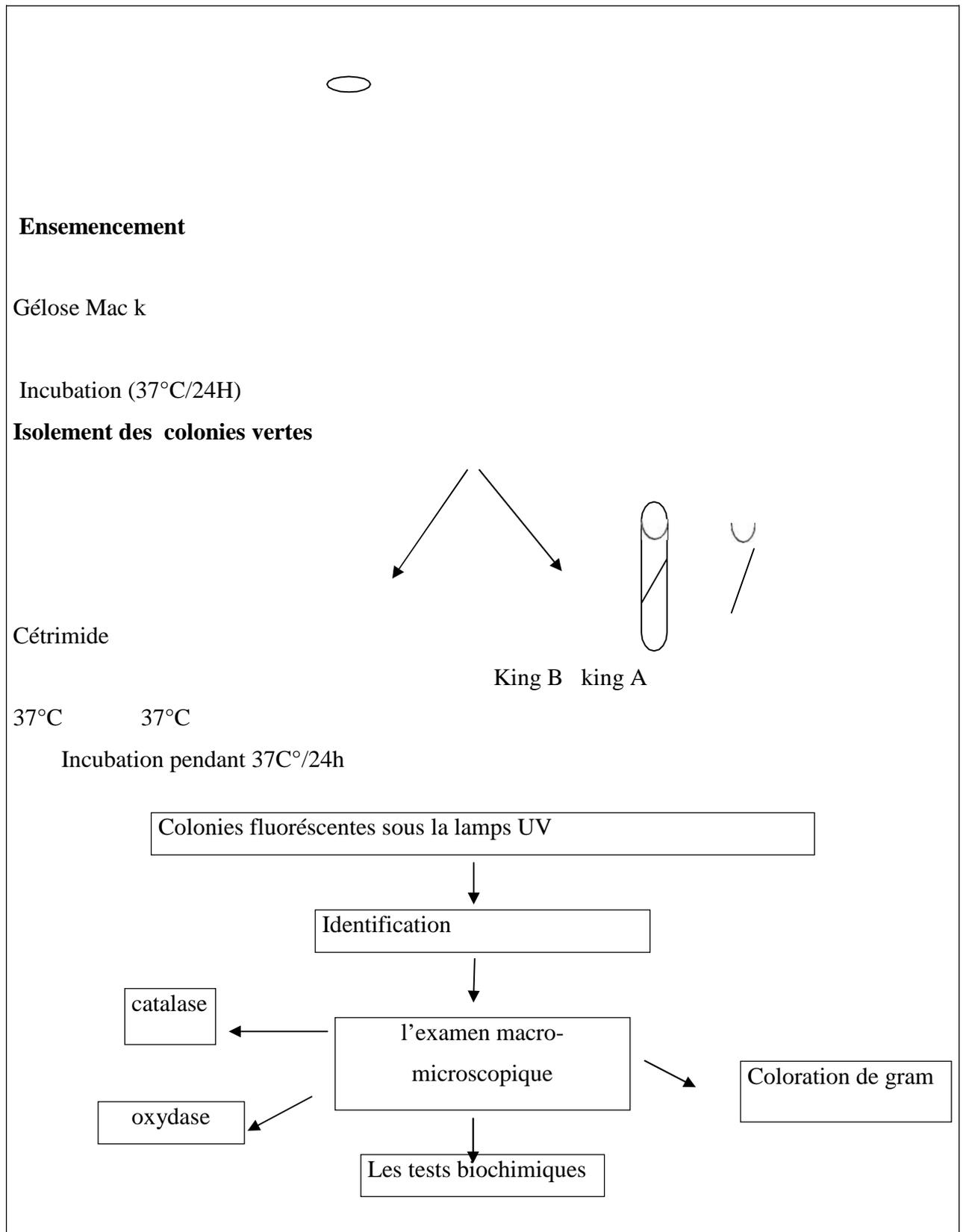


Figure 21: schéma générale de la procédure d'isolement, et d'identification des isolats bactériens.

.Observation de la fluorescente sous UV :

Selon Bultreys et LeGheysen, (2000), Olmar *et al.*,(2001) l'étape initiale pour l'identification des *Pseudomonas aeruginosa* et la mise en évidence d'une activité fluorescente.

Le milieu Cétrémide ou King B coulé dans les boîtes de pétri contenant des colonies bactériennes pures sont exposées sous une lampe UV et à une longueur d'onde 366nm.

Les isolats à fluorescence positive émis des lumières fluorescentes sous la lampe.

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 de bactéries à gram négatif.

Observation à l'état frais :

Déposer une ou deux gouttes de l'eau distillée à l'aide d'une pipette pasteur, puis prélevé une parcelle de colonie à observer. L'observation est réaliser au microscope au grossissement x40 ou x60.

Coloration de gram :**Principe :**

C'est la coloration de base en Bactériologie et elle permet une classification des bactéries selon leur structure. Elle est l'un des caractères essentiels de la classification des bactéries. Plusieurs facteurs vont intervenir dans cette coloration : - la différence de composition chimique de bactéries - la différence de perméabilité de la paroi bactérienne à l'alcool.

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 cristal violet, laisser agir une minute (violet de gentiane)
- 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.
- rejeter la fuchsine, lavée abondamment, égoutté, sécher entre deux feuilles de papier buvard propres.

Lecture:

A la coloration de Gram, on voit des bacilles ou diplobacilles à Gram négatif colorées en rose.

Test de confirmatif :

On réalise un ensemencement sur la gélose nutritive (GN) incliné qui est étuvé à 28°C pendant 48 heures.

Test biochimiques :

Bien que les tests biochimiques constituent une approche classique pour l'identification des bactéries, il n'en demeure pas moins qu'ils sont particulièrement utiles pour la détermination de certaines espèces de bactéries pathogènes.

Oxydase :

Les *Pseudomonas* sont aérobies strictes, elles se développent en présence d'oxygène sur des surfaces de gélose. Le caractère oxydase positif signifie que la souche possède une enzyme capable d'oxyder employé par l'oxygène de l'air.

Principe :

Il permet de mettre en évidence la présence de l'enzyme cytochrome C oxydase

Mode opératoire :

On utilise le disque de papier filtre OX, imprégné de réactif oxalate de N-diéthylparaphénylène diamine, le disque est placé sur une lame et imbibé d'une goutte de la suspension bactérienne.

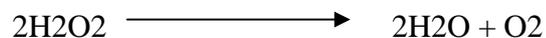
Lecture :

Une coloration rose se manifeste en quelques minutes en cas de réaction positive.

Catalase :

Certaines réactions métaboliques bactériennes aboutissent en aérobiose, à la production de peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée). Le peroxyde d'hydrogène doit être éliminé, car c'est un poison cellulaire (il est d'ailleurs utilisé comme antiseptique). Sa décomposition dans l'organisme microbien peut être réalisée par la catalase. En absence de système enzymatique destructeur, la vie aérobie devient généralement impossible : les microorganismes sont alors anaérobies stricts.

Donc la catalase est produite en abondance par les bactéries à métabolisme respiratoire (aérobie strict et aérobie-anaérobie facultatif), elle catalyse.

**Mode opératoire :**

Déposer sur une lame de verre une ou deux gouttes d'eau oxygénée à 10 volumes. Prélever à l'aide de l'effilure d'une pipette pasteur un fragment de colonie et dissocier la culture dans l'eau oxygénée.

Mannitol mobilité :

Ce milieu est faiblement gélosé qui contient du mannitol et l'indicateur coloré.

Principe :

On met en évidence la dégradation du mannitol et la mobilité du germe.

Mode opératoire :

Introduire dans le milieu une colonie avec une pipette pasteur stérile par piqure centrale au fil droit .incuber le tube à 28°C pendant 48heures

Lecture :

La dégradation du mannitol se traduit par changement de couleur, le rouge en jaune du à l'acidification du milieu .les bactéries immobiles se développent seulement au niveau de la piqure par contre les bactéries mobiles sont diffusées dans le milieu.

Citrate de Simmons :

Ce milieu est un exemple de milieu synthétique, c'est-à-dire de milieu dont la composition, qui est complexe, est connue exactement tant qualitativement que quantitativement

Principe :

Utilisation du citrate comme source de carbone.

Mode opératoire :

La pente estensemencée par une strie longitudinale, réalisée à l'anse, à partir d'une suspension de la culture solide en eau distillée stérile.

Il est important de ne pas apporter de substrat carboné. Ainsi l'ensemencement à partir d'une souche pure fournie en bouillon nutritif ou en eau péptonée est impossible.

Ne pas visser le bouchon à fond, afin de permettre les échanges gazeux (en particulier élimination du dioxyde de carbone) .

Mettre à l'étuve 48heures à 28°C.

Lecture :

Virage de l'indicateur de PH au bleu : il y a eu alcalinisation du milieu et la souche est citrate de Simmons +

Pas de virage de l'indicateur de PH : il n'ya pas eu alcalinisation et le milieu ne présente pas de culture. La souche est citrate de Simmons.

Le milieu TSI :**Principe :**

Déterminer la capacité de la bactérie d'utiliser plus d'un des sucres (glucose, lactose ou saccharose), avec ou sans production de gaz, et de produire du sulfure d'hydrogène (H₂S).

Mode opératoire :

En partant d'une colonie, inoculer le culot en piquant avec un fil droit au centre puis inoculer la pente en effectuant une strie sinueuse. Incuber à 28 heures.

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 H₂S : précipité noirâtre plus ou moins abondant.

Dégradation des sucres :

La fermentation des sucres étudiée sur le milieu MEVAG additionné des sucres.

Les sucres testés sont essentiellement : le glucose, le maltose, le saccharose, le lactose et l'amidon.

Principe :

Il est basé le virage de couleur de l'indicateur de pH rouge de phénol.

Mode opératoire :

On rend les tubes de MEVAG sans sucres en surfusion à 45°C pour ajouter les solutions sucrées, laisser refroidir et on lesensemence par piqure à partir d'une colonie bactérienne tout en on présentant les conditions d'asepsie nécessaire, les tubes sont ensuite incubés à 28°C /48heures.

Lecture :

La multiplication cellulaire et le virage de l'indicateur de rouge vers le jaune indiquent l'utilisation du sucre testé.

Le milieu 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 (FeCl_3).

Recherche de métallo-beta-lactamases par le test CDT :**Principe :**

Les métallo-beta-lactamases sont des carbapénemases qui nécessitent un ou deux ions de zinc pour leur fonctionnement catalytique d'où l'inhibition de celui-ci par l'EDTA (chélateur des cations divalents); cette propriété est mise à profit dans des tests de synergie (Aggoune-Khinache *et al.*, 2009).

Mode opératoire :

Le test CDT (CombinedDisk Test Imipenème-EDTA) est réalisé selon Yong *et al* (2002).

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. Deux disques espacés de 2,5 cm

contenant chacun 10 μ g d'imipenème ont été appliqués sur le milieu, et une quantité de 10 μ g d'EDTA (**0.5M, pH 8**) (JunseiChemical, Tokyo, Japon) a été ajouté par la suite à l'un d'eux .

Expression des résultats :

Après 16 à 18 h d'incubation à 37 ° C, les diamètres des zones d'inhibition sont notés en millimètre (mm).

Extraction semi-purifié de beta-lactamases :

Des extraits semi purifiés de beta-lactamases ont été préparés à partir de la souche *Pseudomonas aeruginosa*, qui se sont avérées selon les résultats du test CDT, productrice des beta-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 erlens de 1L de volume à raison de 250 ml par erlen. Après stérilisation (autoclave SELECTA. P), 250 ml de bouillon sont inoculés au préalable par la souche de *P.aeruginosa* puis incubées à 37°C pendant 18 h

L'inoculum obtenu est utilisé pour ensemercer les cinq erlenmeyers restantes à raison de 50 ml d'inoculum par erlenmayer. Après addition de 50 μ g d'imipenème à chaque erlenmayer (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.

Les culots cellulaires récupérés dans du tampon phosphate (0.1M, pH 7) sont homogénéisés

La récupération est réalisée par les étapes suivantes :

- On a mesuré 1g de culot et après introduire chaque 1g dans un 80 ml des tampon phosphate
- Les homogénats obtenues sont centrifugées à 10000 g pendant 40 minutes à 4°C. Les surnageant obtenus sont poolés. Le pool est agité pendant 90 min en présence de sulfate d'ammonium.
- Le mélange est recentrifugé à 17 000 g pendant 30 minutes à 4°C.

Les culots récupérés dans du tampon phosphate et ensuite dialysé contre le tampon phosphate (0.1M, pH 7) pendant 24h. Le dialysat, concentré par incubation avec le tampon

phosphate constitue notre extrait semi-purifié de beta-lactamases et est répartie dans des tubes eppendorf à raison de 200µl par tube puis conservé à -20°C jusqu'à utilisation.

Analyses quantitatives :

Analyse quantitative des protéines dans les extraits semi-purifiés de beta-

lactamases Principe :

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 beta-lactamases.

Résultats

Et

Discussion

Résultats et discussion

.Caractéristiques de la matière première (*Deglet-Nour*) :

Les caractéristiques physiques de la datte étudiée sont représentées dans le tableau 11.

Tableau 11 : Caractéristiques physiques de la datte *Deglet-Nour*.

paramètre	Valeurs moyenne
Couleur	marron
Consistance	demi-molle
Longueur de la datte (cm)	3.65 ± 0.47
Longueur du noyau (cm)	2.32 ± 0.20
Largeur (diamètre) de la datte entière (cm)	1.78 ± 0.09
Largeur (diamètre) du noyau (cm)	0.80 ± 0.04
Rapport pulpe/datte (%)	87.29
Rapport noyau/datte (%)	12.8

II. Obtention et caractérisation des extraits de datte fraîche :

Couleurs et aspects des extraits :

Les deux extraits obtenus après évaporation des solvants sont les suivants :

1. Les extraits acétone et acide acétique (procyanidine) (une pâte huileuse de coloration marron, à bon rendement.
2. Les extraits méthanoïques: une pâte huileuse de coloration marron à faible rendement.

III. Rendement des extractions :

Le rendement des extraits méthanolique (flavonoïdes) sont de 23.39%. il est faible par rapport aux extraits des procyanidines 48.91%.

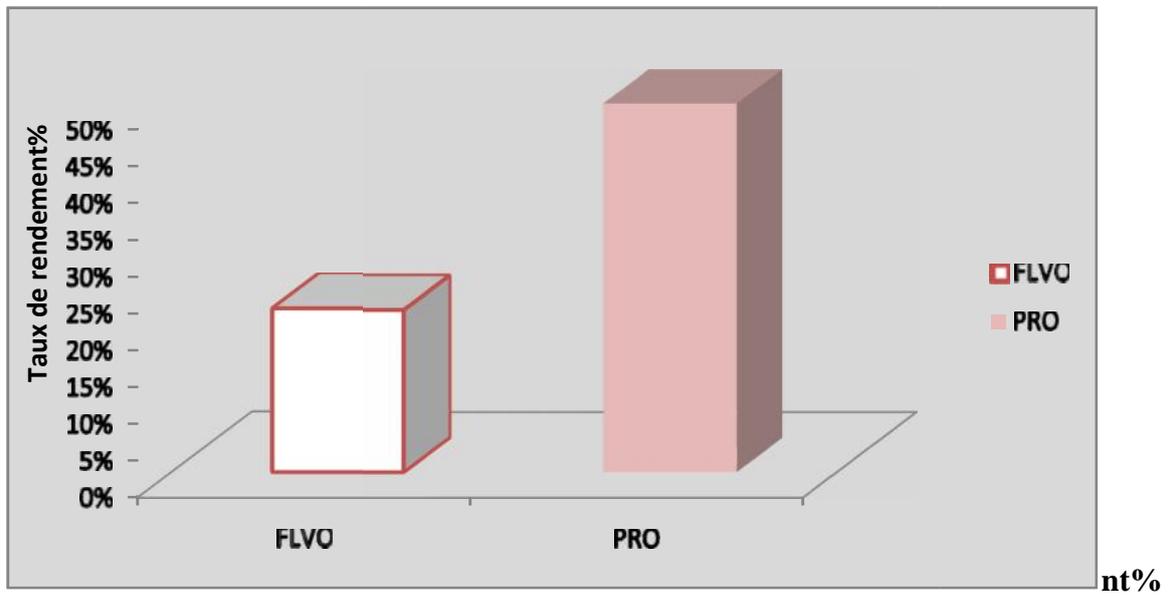


Figure 22. : Comparaison des rendements des deux extraits (en% du poids frais)

Résultats et discussion

VI. Résultats d'analyses microbiologiques :

Identification phénotypique des pseudomonas fluorescents :

L'identification de la souche étudiée, qui se présente par des colonies vertes bombées (figure), a été réalisé sur la base des méthodes phénotypique selon les méthodes décrites par Stanier *et al* ; 1966, Doudroff et palleroni , 1974 ; Holt *et al* ; 1994 , Bossiset *al* ; 2000.



Figure 23 : morphologie macroscopique de S sur Mac cankey.

Les résultats obtenus lors de l'étude phénotypique montrent que toutes les deux souches qui on a obtenue sont des Gram négative (figure)

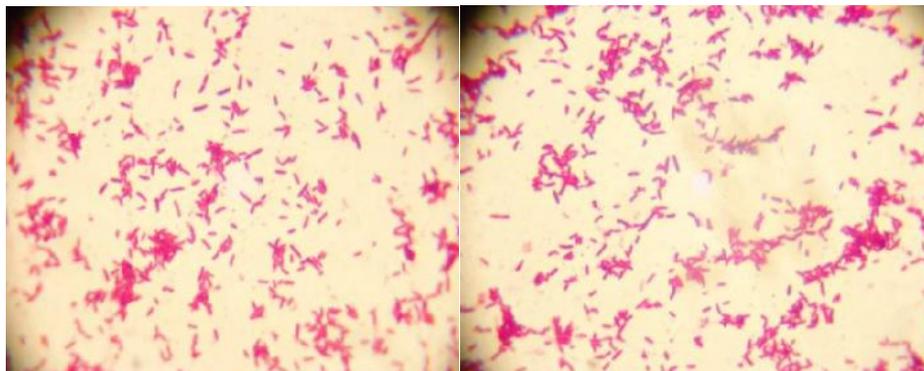


Figure 24 : l'observation microscopique après coloration de gram

Résultats et discussion

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.

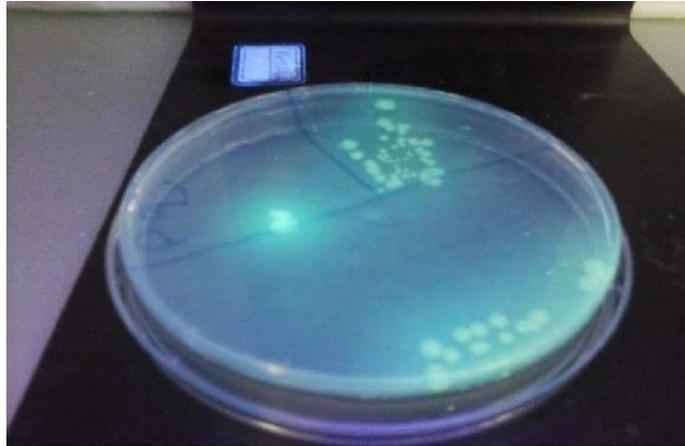


Figure 25 : La mise en évidence de la fluorescence sur milieu Cétrimide sous
UV _{366nm}

Résultats et discussion

Identification biochimique

Les résultats d'identification biochimique de 3 souches de *P. fluorescens* selon la clé dichotomique et après les tests de sont illustrés dans le tableau et la figure .

Souches \ Test	S1	S2	S 3
Oxydase	+	+	+
Catalase	+	+	+
TSI	+	+	+
Pectine	+	+	+
ADH	+	+	+
N.Red.	+	+	+
MEVAG	+	+	+
Manitol mobilité	+	+	+
Citrate de simmons	-	-	-
Fluorescents	+	+	+
Espèce			

Résultats et discussion

V. Détection phénotypique de métallo-beta-lactamases par le test CDT :

La mise en évidence d'une résistance à l'imipénème et la mise en évidence de la disparition de celle-ci, a été réalisée sur une souche clinique par le test CDT (Combined Disk Test Imipénème-EDTA) qui consiste en l'incubation de ces dernières 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 résiste à l'imipénème (diamètre des zones d'inhibition égale à 9 mm) contrairement par pour le deuxième disque (diamètre confondu supérieur à 13 mm). Lorsqu'on rajoute de l'EDTA.

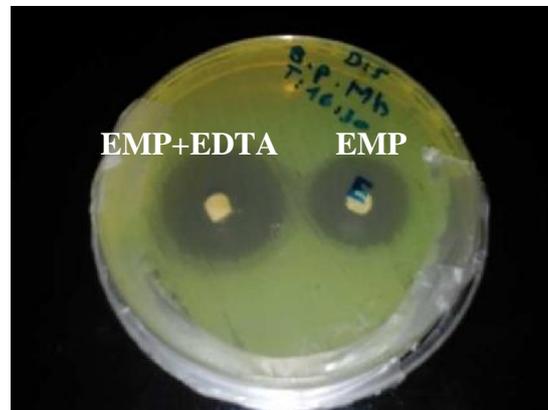


Figure 25: les zones d'inhibitions de la croissance des bactéries testées sur Gélose Mueller Hinton, après 16 à 18 h d'incubation en présence d'imipénème seul (10 μ g) et d'imipénème (10 μ g) plus EDTA (1900 μ g). IMP= imipénème

Extraits semi-purifiés de beta-lactamases

V.1.1. Analyse quantitative des protéines :

Extrait semi-purifiés de beta-lactamases ont été obtenus à partir d'homogénéatde culots cellulaires bactériens de isolat cliniques *P.aeruginosa*.

Le teneur 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 extrait 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

Résultats et discussion

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 26**). Ce teneur est de l'ordre de 0,226 et 0,033 mg/ml, respectivement dans l'extrait semi purifié de betalactamase à partir de *P.aeruginosa*.

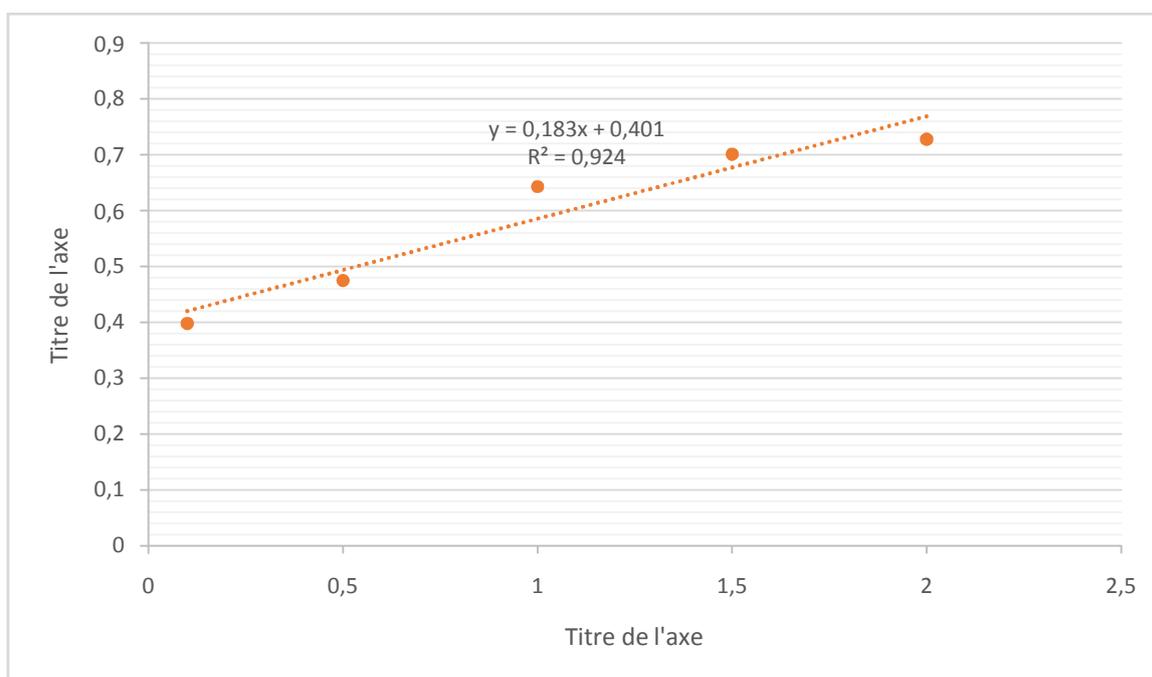


Figure 26 : Droite d'étalonnage tracée en fonction de concentration croissante de BSA et les absorbances relatives à 595 nm (Moyenne \pm SD de trois mesures).

Résultats et discussion

Essais d'inhibition de l'activité enzymatique par flavonoïdes et procyanidines de commerce de fruits secs de *Phoenyxdactylifera* :

Les essais ont été réalisés à l'aide de flavonoïdes et procyanidines de commerces à savoir de fruits secs de *Phoenyxdactylifera*.

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

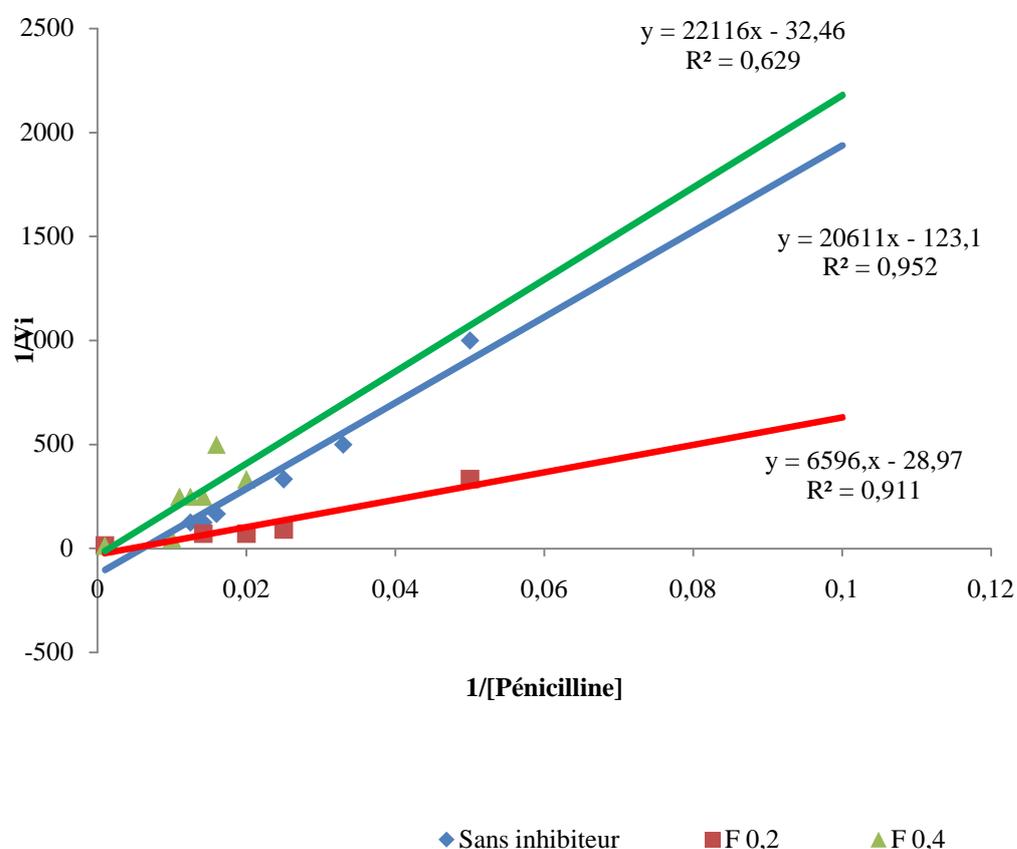


Figure 27 : Courbe de lineweaver-burk tracées en fonction de l'inverse des vitesses d'hydrolyses de concentrations finales croissantes de pénicilline G par l'extrait semi-purifié à partir de *Pseudomonas aeruginosa* en présence et en absence de concentrations 0,66 de concentration 1,33 mg /ml

Conclusion
&
Perspectives

Conclusion

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 (Cornaglia *et al.*, 2011). 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 (*Phoenix dactylifera*), ensuite de mettre en évidence, s'il y a lieu, l'effet inhibiteur de ces extraits sur des métallo-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' *Phoenix dactylifera* inhibe incompétitivement 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:

Conclusion

- 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

Références bibliographiques

1. **Abraham E. P, et Chain E. 1940.** An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature*. 146: 837.
2. **Abraham EP, Chain E.** An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature* 1966;146:837.
3. **Abriata LA, González LJ, Llarrull LI, Tomatis PE, Myers WK, Costello AL, Tierney DL and Vila AJ.** Engineered Mononuclear Variants in *Bacillus cereus* Metallo- β -lactamase BcII Are Inactive. *Biochemistry*. 47:8590-8599; (2008).
4. **Al-Hooti S., Sudhus S. and Gabazard H.** (1998). Chemical composition of seeds of date fruit cultivars of United Arab Emirates. *J.FoodChem.Technol.* 35: 44-46.
5. **Al-Shahib W. and Marshall R J.** (2002). Dietary fibre content of dates from 13 varieties of
6. **Altiok, E., Baycin, D., Bayraktar, O., Ulku, S., (2008).** Isolation of polyphenols from the extracts of olive leaves (*Olea europaea L.*) by adsorption on silk fibroin. *Sep. Purif. Technol.*, 62(2), 342-348.
7. **Ambler, R.P.** (1980). The structure of β -lactamases. *Phil Trans R Soc Lond Biol Sci.* 289: 321-331.
8. **Aydogan C,** *Phytotherapy Research* 2008, 9:1239 - 1242
9. **Babic M., Hujer A. M., Bonomo R. A.** (2006). What's new in antibiotic resistance? Focus on β -lactamases. *Drug Resistance Updates*, 9:142- 156.
10. **Babic M., Hujer A. M., Bonomo R. A.** (2006). What's new in antibiotic resistance? Focus on β -lactamases. *Drug Resistance Updates*, 9:142- 156.
11. **Bandoh K, Muto Y., Watanabe K., Katoh N., Ueno K. 1991.** Biochemical properties and
12. **Barrial, K., and Scotet, J.** (2006). Classification raisonnée des β -lactamases chez les bacilles Gram négatif. *Perspective d'évolution. Tigaud de bactériologie.* 3-10.
13. **Bebrone C.** Metallo- β -lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. *Biochem.Pharmacol.* 74: p.1686–1701; (2007).
14. **Belguedj M.** (2001). Caractéristiques des cultivars de dattes dans les palmeraies du Sud-Est.
15. **Bellais S, Aubert D, Naas T, Nordmann P.** Molecular and biochemical heterogeneity of class B carbapenemhydrolyzing metallo- β -lactamases in *Chryseobacterium meningosepticum*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:1878–86
16. **Benavente-Garcia, O., Castillo, J., Lorente, J., Ortuno, A., Del Rio, J. A., (2000).** Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea L.*-leaves. *Food Chemistry*, 68(4), 457-462.
17. **Benchabane A.** (1996). Rapport de synthèse de l'atelier "Technologie et qualité de la datte".
18. **Benchelah, A.-C. et Maka, M.** (2008). Les Dattes, intérêt et nutrition.
19. **Beta, T., Nam, S., Dexter, J.E. Sapirstein, H.D., (2005).** Phenolic Content and antioxidant activity of Pearled Wheat and Roller-Milled fractions. *Cereal Chem.*, 82(4), 390-393.
20. **Bonomo R. A., Dawes C. G., Knox J. R. and Shlaes D. M.** (1995). β -lactamase mutations far from the active site influence inhibitor binding. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1247: 121-125.
21. **Boschi L, Mercuri PS, Riccio ML, Amicosante G, Galleni M, Fre're JM, et al.** The Legionella (*Fluoribacter*) gormanii metallo- β -lactamase: a new member of the highly divergent lineage of molecular-subclass B3 beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:1538–43.
22. **Boudhrioua, N., Bahloul, N., Ben Slimen, I., Kechaou, N. (2009).** Comparison on the total phenol contents and the color of fresh and infrared dried olive leaves. *industrial crops and products*, 29, 412–419.
23. **Bounaga S, Laws AP, Galleni M and Page MI.** The mechanism of catalysis and the inhibition Of *the Bacillus cereus* zinc-dependent betalactamase. *Biochem. J.* 331, pp: 703-711, (1998).
24. **Breece RM, Llarrull LI, Tioni MF, Vila AJ and Tierney DL.** X-ray absorption spectroscopy of metal site speciation in the metallo- β -lactamase BcII from *Bacillus cereus*. *Journal of Inorganic Biochemistry* 111. 182–186; (2012).
25. **Bruneton, J., (1993).** Pharmacognosie. Technique et documentation-Lavoisier, Paris, p.278.
26. **Bush K, Jacoby GA and Medeiros AA.** A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother*; 39: 1211 -33; (1995).
27. **Bush K.** (1989). Classification of β -Lactamases: Groups 2c, 2d, 2e, 3, and 4.

Références bibliographiques

- Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 33(3): 271-276.
28. **Bush K.** (1989). Characterization of β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 33(3): 259-263.
 29. **Bush K., Jacoby G. A. and Medeiros A. A.** (1995). A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(6): 1211-1233.
 30. **C., Frère J. M., Galleni M., Goffin C., Joris B., Lamotte-Brasseur J. Et Nguyen -Distèche M.** (1998). Résistance bactérienne aux β -lactamines. *Médecine/sciences*, 14: 544-555.
 31. **Carfi A, Pares S, Duez E, Galleni M, Duez C, Frère JM and Dideberg O.** The 3-D structure of a zinc metallo- β -lactamase from *Bacillus cereus* reveals a new type of protein fold. *The EMBO Journal* vol.14: 4914-4921; (1995).
 32. **Carrion, Y., Ntinou, M., Badal, E. (2010).** *Olea europaea* L. in the North Mediterranean Basin during the Pleniglacial and the Early-Middle Holocene. *Quaternary Science Reviews* 29: 952-968.
 33. **Castanheira, M., Mendes, R. E., Walsh, T. R., Gales, A. C., and Jones, R. N.** (2004) Emergence of the extended-spectrum β -lactamase GES-1 in a *Pseudomonas aeruginosa* strain from Brazil: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 2344-2345.
 34. **Caturla, N., (2005).** The olive leaf extract exhibits antiviral activity against viral haemorrhagic septicemia rhabdovirus (VHSV). *Antiviral Res.*, 66(2-3):129-36.
 35. **Chakraborty S, Ásgeirsson B, Minda R, Salaye L, Frère JM and Rao BJ.** Inhibition of a cold-active alkaline phosphatase by imipenem revealed by in silico modeling of metallo- β -lactamase active sites. *FEBS Letters* 586. pp: 3710-3715; (2012).
 36. **Charlier J., Coyette P., Dehareng D., Dive G., Duez C., Dusart J., Fonzé E., Fraipont C.**
 37. **Charlier P, Coyette J, Dehareng D, Dive G, Duez C, Dusart J, Fonzé E, Fraipont C, Frère J M, Galleni M, Goffin C, Joris B, Lamotte-Brasseur J and Nguyen-Distèche M.** Résistance bactérienne aux β -lactamines. *Med. Sci. Res.*, 14: 544 - 555; (1998).
 38. **Chemotherapy, 39(6): 1211-1233.**
 39. **Chen CC and Herzberg O.** Structures of the acyl-enzyme complexes of the *Staphylococcus aureus* β -lactamase mutant Glu166Asp:Asn170Gln with benzylpenicillin and cephaloridine. *Biochem. J.*, 40: 2351-2358. (2000).
 40. **Cherif S., Rahal N,** A clinical trial of a titrated *Olea* extract in the treatment of essential arterial hypertension, *J Pharm Belg* 1996, 69-71
 41. **Cornaglia, G., Giamarellou, H., and Rossolini, G. M.** (2011) Metallo- β -lactamases: a last frontier for β -lactams? *Lancet Infect Dis* 11: 381-393.
 42. **Cronquist, A., (1981).** An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press.
 43. **De Seny D, Heinz U, Wommer S, Keifer M, Meyer-Klauche W, Galleni M, Frère J M, Bauer R and Adolph H W.** Metal ion binding and coordination geometry for wild type and mutants of metallo- β -lactamase from *Bacillus cereus* 569/H/9 (Bc II) - a combined thermodynamic, kinetic, and spectroscopic approach. *The Journal Biological Chemistry*. 276: 45065-45078; (2002).
 44. **DEVSHONY S., ETESSHOLA E. et SHANI A.** (1992). In : UCCIANI EUGENNE (1995). Nouveau dictionnaire des huiles végétales. Techniques et documentation, Lavoisier.
 45. **Djouab, A., (2007).** Contribution à l'identification des constituants mineurs de la datte Mech-Degla. Essai de valorisation par incorporation dans une recette de Djerbi M, (1994). Précis de phéniculture, F.A.O, Rome. p 191.
 46. **Djouab, A., (2007).** Contribution à l'identification des constituants mineurs de la datte Mech-Degla. Essai de valorisation par incorporation dans une recette de margarine allégée. Mémoire de Magister. option génie alimentaire, Université de Boumerdes. 24 p
 47. **Drawz SM, and Bonomo RA.** Three Decades of β -Lactamase Inhibitors. *Clinical Microbiology Reviews*. 23:160-201 ; (2010).
 48. **Drawz SM, and Bonomo RA.** Three Decades of β -Lactamase Inhibitors. *Clinical Microbiology Reviews*. 23:160-201 ; (2010).
 49. **Dugal S and Fernandes A.** Carbapenem hydrolyzing metallo- β -actamases: a review. *Int J Curr Pharm Res*, 3: 9 16 (2011).
 50. **Ed. ORSTOM , Lavoisier, INRA.** 27-28 p.

Références bibliographiques

51. **Erbay, Z., Icier, F.**, (2009). Optimization of hot air drying of olive leaves using response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 91, 533-541.
52. **Espiard E.** (2002). Introduction à la transformation industrielle des fruits. Ed. Tech et Doc Lavoisier, Paris. pp 147-155.
53. **Essack S. Y.** (2001). The development of β -lactam Antibiotics in Response to the evolution of β -lactamases. *Pharmaceutical Research*, 18(10): 1391-1399.
54. **Estanove P.** (1990). Note technique : Valorisation de la datte. In : Options méditerranéennes, série A, N°11. Systèmes agricoles oasiens. Ed. CIHEAM. pp 301-318. **Espiard E.** (2002). Introduction à la transformation industrielle des fruits. Ed. Tech et Doc Lavoisier, Paris. pp 147-155.
55. extended spectrum β -lactamases. *Clinical review*, 327: 1209-1213.
56. **Faridoon and Islam N UL.** An Update on the Status of Potent Inhibitors of Metallo- β -Lactamases. *Sci Pharm J.* 81: 309-327. (2013).
57. **Favier A.** (2003) Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*. a108-115.
58. **Favier J.C., Ireland R.J., Laussucq C. et Feinberg M.** (1993). Répertoire général des aliments. Table de composition des fruits exotiques, fruits de cueillette d'Afrique. Tome III, Ed. ORSTOM, Lavoisier, INRA. 27-28 p.
59. **Favier J.C., Ireland R.J., Laussucq C. et Feinberg M.** (1993). Répertoire général des aliments. Table de composition des fruits exotiques, fruits de cueillette d'Afrique. Tome III,
60. **Fegeros, K., Zervas, G., Apsokardos, F., Vastardis, J., Apostolaki, E.** (1995). Nutritive evaluation of ammonia treated olive tree leaves for lactating sheep. *Small Ruminant Research*, 17, 9-15.
61. **Felici A, Amicosante G, Oratore A, Strom R, Ledent P, Joris B, et al.** An overview of the kinetic parameters of class B β -lactamases. *Biochem J* 1993;291:151-5.
62. **Fleming A.** On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. 1929. *Bull World Health Organ* 2001; 79: 780- 790.
63. **Frère J.M.** (1995). β -lactamases and bacterial resistance to antibiotics. *Molecular Microbiology*, 16(3): 385-395.
64. **Fylaktakidou, K.C., Hadjipavlou-Litina, D.J., Litinas, K.E., Nicolaidis, D.N.**, (2004). Natural and synthetic coumarin derivatives with anti-inflammatory/antioxidant activities. *Curr.Pharm. Des.* 10(30), 3813-3833.
65. **Galleni. M, Lamotte-Brasseur. J, Rossolini. G.M, Spencer. J, Dideberg. O, Frere. J.M,** Standard numbering scheme for class B β -lactamases, *Antimicrob Agents Chemother*, 45 (2001) 660-663.
66. **Garau G, Bebrone C, Anne C, Galleni M, Frère JM, and Dideberg O.A** Metallo- β -lactamase Enzyme in Action: Crystal Structures of the Monozinc Carbapenemase CphA and its Complex with Biapenem. *J. Mol. Biol.* 345, 785-795; (2005).
67. **Garcia-Gomez, A., Roig, A., Bernal, M.P.,** (2003). Composting of the solid fraction of olive mill wastewater with olive leaves: organic matter degradation and biological activity. *Bioresource Technology*, 86, 59-64.
68. **Gaudy C. et Buxeraud J.** (2005). Antibiotiques: pharmacologie et thérapeutique. Ed. Collection PHARMA. pp 35, 65, Paris, France.
69. **Gaussorgues, R.,** (2009). L'olivier et son pollen dans le bassin méditerranéen. Un risque allergique ? *Revue française d'allergologie*, 49 : 2-6.
70. **Ghedira, K.,** (2008). L'Olivier. *Phytothérapie*, 6(2), 83-89.
71. **González JM, Medrano Martín F, Costello AL, Tierney DL and Vila AJ.** The Zn²⁺ Position in Metallo- β -Lactamases is Critical for Activity: A Study on Chimeric Metal Sites on a Conserved Protein Scaffold. *J. Mol. Biol.* 373: 1141-1156; (2007).
72. **Gupta V.** Metallo β lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *Expert Opin. Investig. Drugs* 17:131-143, (2008).
73. **Habtemariam, S.,** (2003). Cytotoxic and cytostatic activity of erlangerins from *Commiphora erlangeriana*. *Toxicol.* 41 (6), 723-7.
74. **Hall L. M., Livermore D. M., Gur D., Akova M., Akalin H. E.** 1993. OXA-11, an extended spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 37(8): 1637-1644.
75. **Harborne, J. B., Simmonds, N. W.,** (1964). *Biochemistry of Phenolic Compounds*, Academic

Références bibliographiques

- Press, LoHarborne, J. B., Simmonds, N. W., (1964). *Biochemistry of Phenolic Compounds*, Academic Press, London, pp. 101-137, pp. 101.
76. **Henk J., Zwir E. et Rik, L.** (2003). Caroténoïdes et flavonoïdes contre le stress oxydatif. *Arômes Ingrédients Additifs*. 44: 42-45.
77. **Herzberg, O., Fitzgerald. P.M.D.** Metallo- β -lactamases, in: *Handbook of metalloproteins*, John Wiley & Sons, Ltd, 2006, pp. 217-234.
78. **Hu Z, Periyannan GR and Crowder MW.** Folding strategy to prepare Co(II)-substituted metallo- β -lactamase L1. *Anal Biochem*; 378: 177-183; (2008).
79. **Jack G. W., Sykes R. B., Richmond M. H.** (1970). The β -lactamases of Gram-negative bacteria. *Postgrad Med J: Suppl*: 41-43.
80. **Jacoby G. A., Medeiros A. A.** 1991. More extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 1697-1704.
81. **Jaurin, B., AND Grundstrom, T.** (1981). *ampC* cephalosporinase of *Escherichia coli* K12 has a different evolutionary origin from that of β -lactamases of the penicillinase type. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 78(8): 4897-4901.
82. Karakaya, S., (2004). Bioavailability of phenolic compounds. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 44 (6), 453- 64.
83. **Karsisiotis AI, Damblon C and Roberts GCK** "A variety of roles for versatile zinc in metallo- β -lactamases" *.Metalomics*, PMID: 24696003, DOI: 10.1039/C4MT00066H. (2014).
84. **Karsisiotis AI, Damblon Cf, Roberts Gck.** structures of the *Bacillus cereus* metallo- β -lactamase BcII and its complex with the broad spectrum inhibitor R-thiomandelic acid. *Biochem. J.* 456, pp: 397–407; (2013).
85. **Khalil K.E., Abd-El-Bari M.S, Hafiz .N.E. and Ahmed E.Y.** (2002). Production, evaluation and utilization of date syrup Concentrate (Dabis). *Egypt. J. Food Sci*, 30(2): 179-203.
86. **Kim Y, Tesar C, Mire J, Jedrzejczak R and Binkowski A,** et al. Structure of Apo- and Monometalated Forms of NDM-1-A Highly Potent Carbapenem-Hydrolyzing Metallo- β -Lactamase. *PLoS ONE* 6(9): e24621. doi:10.1371/journal.pone.0024621: (2011).
87. **Knox J. R.** 1995. Extended-spectrum and inhibitor-resistant TEM-type β -lactamases: mutations, specificity, and three-dimensional structure. *Antimicrob Agents Chemother.* 39(12): 2593-2601.
88. **Laraki N, Franceschini N, Rossolini GM, Santucci P, Meunier C, de Pauw E, Amicosant G and Frere JM, Galleni M.** Biochemical characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* 101/1477 metallo- β -lactamase IMP-1 produced by *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:902–906; (1999).
89. **Laurettil, L., Riccio, M.L., Mazzariol, A., Cornaglia, G., Amicosante, G., Fontana, R., and Rossolini, G.M.** (1999) Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 1584-1590.
90. **Lavigne J.P., Sotto A., Merle C., Jourdan J., Soussy C. J. et Sirot D.** (2002). Résistance enzymatique d'*Escherichia coli* aux β -lactamines et prévalence en clinique. *Pathology and Biology.* 50: 388- 93.
91. **Leong, L.P., Shui, G.** (2002). An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chem.* 76, 69-75.
92. **Lienard. B.M.R., Papamicael. C, Schofield. C.J, Garau. G, Dideberg. O, Horsfall. L, Lassaux. P, Galleni. M, Frere. J. M, Karsisiotis. A.I, Damblon. C, Roberts. G.C.K,** Structural basis for the broad-spectrum inhibition of metallo- β -lactamases by thiols, *Org Biomol Chem*, 6 (2008) 2282 - 2294.
93. **Livermore DM, Woodford N.** The β -lactamase threat in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends Microbiol* 2006; 14:413-420.
94. **Livermore, D.M.** (1995). "Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance." *Clin*
95. **Lo Scalzo, R., Scarpati, M.L., Verzebnassi, B., Vita, G.,** (1994). *Olea europaea* chemical repellent to *Dacis oleae* females. *J. Chem. Ecol.*, 20, 1813-1923.
96. **Macheix J.-J., Fleuriet A. et Sarni-Manchado P.,** (2003). Composés phénoliques dans la plante - Structure, biosynthèse, répartition et rôles. Dans *Les polyphénols en agroalimentaire*; Sarni-Manchado P. et Cheynier V., Eds.; Lavoisier: Paris; pp 1-28.
97. **Maiti S. N., Kamalesh Babu R. P. and Shan R.** (2006). Overcoming bacterial resistance: role of β -lactamase inhibitors. *Top Heterocyclic Chemistry*, 2: 207-246.

Références bibliographiques

98. **Majiduddin FK, Materon IC and Palzkill TG.** Molecular analysis of betalactamas structure and function. *Int. J. Med. Microbiol.* 292: 127 - 137 (2002).
99. **Malik, N. S.A., Bradford, J. M., (2006).** Changes in oleuropein levels during differentiation and development of floral buds in "Arbequina" olives. *Scientia Horticulturæ* 110, 274-278.
100. **Mansouri A., Guendez E., Kokkalou E. and Kefalas P.** (2005). Phenolic profile and antioxidant activity of Algerian ripe date palm (Phoenix dactylifera). *Food. Chem.* 89:411-420.
101. **Martin, S., Andriantsitohaina, R. (2002).** Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Ann. Cardiol. Angéiol.* 51, 304-315.
102. **Martin-Garcia, A.I., Molina-Alcaide, E., (2008).** Effect of different drying procedures on the nutritive value of olive (*Olea europaea* var. *europaea*) leaves for ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 142, 317-329.
103. **Matagne A., Lamotte-Brasseur J. and Frère J.M.** (1998). Catalytic properties of class A β -lactamases : efficiency and diversity. *Biochemical Journal*, 330 :581-598.
104. **Medeiros, A.A.** (1984). β -lactamases. *Bnt. Med. Buli.* 40: 18-27.
105. **Micol, V., Caturra, N., Pérez-Fons, L., Más, V., Pérez, L., Estepa, A., (2005).** The olive leaf extract exhibits antiviral activity against viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV). *Antiviral Res.*, 66(2-3):129-36.
106. *Microbiol Rev.* 8(4): 557-584.
107. **Minasov G, Wang H and Shoichet B K.** An ultrahigh resolution structure of TEM-1 β -lactamase suggests a role for Glu166 as the general base in acylation. *J. Am. Chem. Soc.*, 124: 5333-5340; (2002).
108. **Mollard C, Moali C, Papamicael C, Damblon C, Vessilier S, Amicosante G, Schofield CJ and Galleni M, Frère JM and Roberts GC.** Thiomandelic acid, a broad spectrum inhibitor of zinc β -lactamases: kinetic and spectroscopic studies. *J. Biol. Chem.*, 276: 45015-45023; (2001).
109. **Munier P.** (1973). Le palmier dattier. Ed. Maison Neuve et La rose, Paris. pp 25-28-31-32-40-48-141-142-221-367 .
110. **Mylonaki, S., Kiassos, E., Makris, D.P., Kefalas, P., (2008).** Optimisation of the extraction of olive (*Olea europaea*) leaf phenolics using water/ethanol-based solvent systems and response surface methodology. *Anal. Bioanal. Chem.*, 392(5), 977-985.
111. **Noui Y.** (2001). L'optimisation de la production de la biomasse « saccharomyces cerevisiae » cultivé sur un extrait de datte. Mémoire d'ingénieur. Département d'agronomie. Batna. 62p
112. **Noui, Y.** (2007). Caractérisation physico-chimique comparative des deux tissus constitutifs de la pulpe de datte Mech-Degla. Mémoire de Magister en génie alimentaire, Université de Boumerdès. 33p.
113. **Ozkaya, M.T, et Celik, M., (1999).** Quantitative analysis of phenolic compounds in olive cuttings. *Acta Horticulturæ*, 474, 477-480
114. **Padayatti P S, Helfand M S, Totir M A, Carey M P, Carey P R, Bonomo R A and Van den Akker F.** High Resolution Crystal Structures of the trans-Enamine Intermediates Formed by Sulbactam and Clavulanic Acid and E166A SHV-1 β -Lactamase. *J. Biol. Chem.* 280: 34900-34907; (2005).
115. **Page MI, Badarau A.** The mechanisms of catalysis by metallo- β -lactamases. *Bioinorganic Chemistry and Applications.* pp: 1-14. (2008). ISSN 1565-3633.
116. **Payne DJ, Bateson JH, Gasson BC, Proctor D, Khushi T, Farmer TH, Tolson DA, Bell D, Skett PW and Marshall AC.** Inhibition of metallo- β -lactamases by a series of mercaptoacetic acid thiol ester derivatives. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol.41, No.1. p. 135-140; (1997).
117. **Payne DJ.** Metallo- β -lactamases: a new therapeutic challenge. *J. Med. Microbiol* Vol.39. p. 93-99. (1993).
118. **Philippon A., Labia R., Jacoby G.** 1989. Extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 33(8): 1131-1136.
119. *Phytothérapie (ethnobotanique).* 6: 117 - 121 .
120. **Poirel, L., Naas, T., Nicolas, D., Collet, L., Bellais, S., Cavallo, J.D., and Nordmann, P.** (2000) Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 891-897.
121. **Pollini, S., Maradei, S., Pecile, P., Olivo, G., Luzzaro, F., Docquier, J.D., and Rossolini, G.M.** (2013) FIM-1, a new acquired metallo-beta-lactamase from a

Références bibliographiques

- Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Italy. *Antimicrob Agents Chemother* 57: 410-416.
122. **Prosperi-Meys C, Llabres G, de Seny D, et al.** Interaction between class B beta-lactamases and suicide substrates of active-site serine beta-lactamases. *FEBS Lett.* 1999 Jan 25;443(2):109-11.
123. purification of metallo-B-lactamase from *Bacteroides fragilis*. *Antimicrob Agents Chemother.*35(2): 371-372.
124. **Riccio MI, Pallecchi L, Fontana R and Rossolini GM.** In70 of Plasmid pAX22, a bla VIM-1-Containing Integron Carrying a New Aminoglycoside Phosphotransferase Gene Cassette. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol.45: 1249–1253. (2001).
125. **Riedacker A.** (1990). Physiologie des arbres et arbustes en zone aride, Ed J. Libbey Paris.323-327 p.
126. **Robards K., Prenzler P.D., Tucker G., Swatsitang P. Glover W., (1999).** Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*, 66, 401-436.
127. **Rolinson, G. N.** 1998. Forty years of beta-lactam research. *J Antimicrob Chemother* 41:589-603.
128. **Rossolini GN and Docquier JD.** Class B beta-lactamases. In: Enzyme-mediated resistance to antibiotics. EDF: *American Society for Microbiologie* (Washington) p-p: 115-134; (2007).
129. **Sabbagh Y.** Structure-Fonction De La beta-Lactajmase Pse-4: Interactions Inhibiteurs Et Antibiotiques. Mémoire pour l'obtention du grade de maître en sciences (M-Sc.). *Université Laval.* (1998).
130. **Samaha-Kfoury J .N. and Araj G. F.** (2003). Recent developments in -lactamases and
131. **Sanders C. C. 1989.** B-Lactamase stability and in vitro activity of oral cephalosporin's against strains possessing well-characterized mechanisms of resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 33(8): 1313-1317.
132. **Sanoner P., (2001).** Les polyphénols de la pomme à cidre: diversité variétale et oxydation. Thèse de doctorat, Université de Caen, 316 p.
133. **Segatore B, Massidda O, Satta G, Setacci D, Amicosante G.** High specificity of cphA-encoded metallo-beta-lactamase from *Aeromonas hydrophila* AE036 for carbapenems and its contribution to beta-lactam resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:1324–8.
134. **Simm AM, Loveridge EJ, Crosby J, Avison MB, Walsh TR and Bennet PM.** Bulgecin A: a novel inhibitor of binuclear metallo- -lactamases. *Biochem. J.* 387: 585-590; (2005).
135. **Toleman, M.A., Biedenbach, D., Bennett, D.M., Jones, R.N., and Walsh, T.R.** (2005) Italian metallo-beta-lactamases: a national problem? Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Programme. *J Antimicrob Chemother* 55: 61-70.
136. **Toleman, M.A., Simm, A.M., Murphy, T.A., Gales, A.C., Biedenbach, D.J., Jones, R.N., and Walsh, T.R.** (2002) Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *J Antimicrob Chemother* 50: 673-679.
137. **Toney JH, Fitzgerald PM, Sharma NG, Olson SH, May WS, Sundelof JG and Vanderwall DE, Cleary KA, Grant SK, Wu JK.** Antibiotic sensitization using biphenyl tetrazoles as potent inhibitors of *Bacteroides fragilis* metallo- -lactamase. *Chem. Biol.* 5:185–196. (1998).
138. **Toney JH, Moloughney JG.** Metallo-beta-lactamase inhibitors: promise for the future? *Curr Opin Invest Drugs* 2004;5:823–6.
139. **Tsang WY, Dhanda A, Schofield CJ, Frère JM, Galleni M and Page MI.** The inhibition of metallo-beta-lactamase by thioxo-cephalosporin derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* ; 14:1737-1739; (2004).
140. **Uccella, N., (2001).** Olive biophenols : biomolecular characterization, distribution and phytoalexin histochemical localization in the drupes. *Trends Food Science and Technology.*11, 315-327.
141. **ULLAH JH, WALSH TR, TAYLOR IA, EMERY DC, VERMA CS, GAMBLIN SJ, ET AL.** The crystal structure of the L1 metallo- - lactamase from *Stenotrophomonas maltophilia* at 1.7Å° resolution. *J Mol Biol* 1998; 284:125–36.
142. **Vella P, Hussein WM, Leung EWW, Clayton D, Ollis DL, Mitic N, Schenk G and McGeary Rp.** The identification of new metallo-beta-lactamase inhibitor leads from fragment based screening. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.*21: 3282-3285. (2011).
143. **Walsh TR, Toleman MA, Poirel L and Nordmann P.** Metallo- -lactamase: the

Références bibliographiques

- Quiet before the Storm? *Clin Microbiol Rev*, 18: 306-25; (2005).
144. **Walter. F, Sutton. L.D**, Metallo- -lactamase: Inhibitors and reporter substrates, *Biochim*
145. **Watanabe, M., Iyobe, S., Inoue, M., and Mitsuhashi, S.** (1991) Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 35: 147-151.
146. **Wilke M. S., Lovering A. L. and Strynadka N. C.J.** (2005). -lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Current Opinion in Microbiology*, 8: 525-533.
147. **Yahiaoui K.** (1998). Caractérisation physico-chimique et évolution du brunissement de la datte « D-N » au cours de la maturation. Mémoire de Magister. I.N.A. El-Harrach. Alger. 66p.
148. **Zhang YL, Xiao JM, Feng JL, Yang KW, Feng L, Zhou LS and Crowder MW.** A novel fluorogenic substrate for dinuclear Zn (II) - containing metallo-betalactamases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 23 : 1676-1679 ; (2013).
149. **Zhu K, Lu J, Ye F, Jin L, Kong X, Liang Z, Chen Y, Yu K, Jiang H, Li JQ and Luo C.** Structure-based computational study of the hydrolysis of New Delhi metallo- -lactamase-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 431: 2-7; (2013).

Annexes

Annexes

Annexes 1 :

I. Composition des milieux de cultures utilisés dans les analyses microbiologiques

I.1. Les milieux pour isolement des *Pseudomonas*

.2. Milieu Cétrimide

Peptone	20g
Sulfate de potassium	10g
Chlorure de magnésium.....	3g
Glycérol	10ml
Phosphate de potassium	0.3g
Cétrimide	0,2g
Acide nadixique	15mg
Gélose	13g

pH : 7,2 .Autoclaver15min à 120°C

I.1.3. Milieu King B

Protéase-peptone.....	20g
Glycérol	10ml
Phosphate dipotssique	1,5g
Sulfate de magnésium	1,5g
Gélose	15g

pH: 7,2 .Autoclaver20min à 120°C

I.2. Les milieux d'identification

.1. Milieu Mannitol-Mobilité

Peptone tryptique de viande.....	20 g
Mannitol.....	2,0g
Rouge de phénol à 1%.....	4,0ml
Gélose	4,0g

pH: 8,1. Autoclaver5min à120°C

I.2.2. Milieu TSI

Annexes

TSI: Tri- Sugar- Iron agar = gélose – glucose- lactose- saccharose- H₂S

Peptone	20g
Extrait de viande.....	3,0g
Extrait de levure	3,0g
Chlorure de sodium	5,0g
Glucose	1,0g
Lactose	10g
Saccharose	10g
Citrate de fer	0,5g
Hydro sulfite de sodium	0,5g
Gélose	25g

pH : 7. Autoclaver 15min à 115°C

Bouillon nitraté

Bouillon nutritif	1,0g
Nitrate de potassium	1,0g

pH: 7. Autoclave 15min à 120°C

Milieu MEVAG

Extrait de viande	3,0g
Chlorure de potassium.....	5,0g
Rouge de phénol.....	20mg
Gélose	3,0g

pH : 7,7. Autoclaver 15min à 120°C

L'eau physiologique :

Chlorure de sodium	9,0g
L'eau distillée	1000ml

pH : 7. Stériliser 20min à 121°C

Réactifs

Oxydase

Oxydase diméthyle paraphénylène diamine	1,0g
---	------

Annexes

Eau distillée 100ml

Catalase

Eau oxygénée 10 volume

Zinc

Poudre de zinc métallique

Annexe 2 :

II. Colorant et liquide de montage microscopique

II.1. Cristal violet :

II.1.1 Solution A :

Cristal violet	2,0g	
Alcool à 90°C		20ml

Solution B :

Oxalate de NH ₄	0,8ml	
Eau distillée	20ml	

On a mélanger la solution A et B

II.1.3.1. Fuschine :

Fuschine basique	1 g	
Alcool éthylique	10ml	
Phénol	5g	
Eau distillée	100ml	

Pour la coloration de gram, cette solution doit être utilisée à 1/15 ou bien le colorant doit être dilué directement sur la lame (1goutte de colorant sur la lame recouverte d'eau)

III Lygol :

Iode	1,0g	
Iodure de potassium	2,0g	
Eau distillée	300ml	

Annexes

Résultats de la cinétique enzymatique sans inhibiteur

Time	Titl e #1	Titl e #2	Titl e #3	Titl e #4	5 Ba	Titl e #6	Titl e #8	P1 ESS Al #1	Titl e #2	Titl e #3	Titl e #4	Titl e #5	Titl e #6	Titl e #7	Titl e #8	Titl e #9	Titl e #10	Titl e #11	Titl e #12	P1
00:00	3,2		3,3	0,0	0,8		0,3	0,2		0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
:00	0 22 0	0 0 0	0 98 0	0 01 0	0 21 0	0 0 0	0 24 0	0 38 0	0 0 0	0 11 0	0 82 0	0 82 0	0 56 0	0 58 0	0 41 0	0 44 0	0 16 0	0 15		
00:00	3,2		3,5		0,8		0,3	0,0	0,2		0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
:05	0 22 0	0 0 0	0 23 0	0 0 0	0 22 0	0 0 0	0 26 0	0 01 0	0 37 0	0 0 0	0 11 0	0 82 0	0 82 0	0 55 0	0 58 0	0 41 0	0 41 0	0 17 0	0 13	
00:00	3,3		3,3		0,8		0,3		0,2		0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
:10	0 01 0	0 0 0	0 98 0	0 0 0	0 22 0	0 0 0	0 25 0	0 0 0	0 4 0	0 0 0	0 12 0	0 82 0	0 82 0	0 57 0	0 58 0	0 42 0	0 42 0	0 17 0	0 13	
00:00	3,5		3,5	0,0	0,8		0,3		0,2		0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
:15	0 23 0	0 0 0	0 23 0	0 01 0	0 23 0	0 0 0	0 27 0	0 0 0	0 39 0	0 0 0	0 12 0	0 83 0	0 82 0	0 56 0	0 58 0	0 41 0	0 42 0	0 16 0	0 13	
00:00	3,5		3,3	0,0	0,8		0,3		0,2		0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
:20	0 23 0	0 0 0	0 01 0	0 01 0	0 21 0	0 0 0	0 26 0	0 0 0	0 4 0	0 0 0	0 12 0	0 84 0	0 83 0	0 55 0	0 58 0	0 42 0	0 41 0	0 17 0	0 13	
00:00	3,2		3,0	0,0	0,8		0,3		0,2	0,0	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
:25	0 22 0	0 0 0	0 97 0	0 01 0	0 21 0	0 0 0	0 28 0	0 0 0	0 4 0	0 01 0	0 13 0	0 84 0	0 83 0	0 56 0	0 58 0	0 42 0	0 42 0	0 17 0	0 14	
00:00	3,2		3,3	0,0	0,8		0,3		0,2		0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
:30	0 22 0	0 0 0	0 01 0	0 01 0	0 23 0	0 0 0	0 28 0	0 0 0	0 39 0	0 0 0	0 19 0	0 85 0	0 84 0	0 56 0	0 58 0	0 41 0	0 42 0	0 17 0	0 14	
00:00			3,3	0,0	0,8		0,3		0,2		0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
:35	0 4 0	0 0 0	0 01 0	0 01 0	0 25 0	0 0 0	0 29 0	0 0 0	0 4 0	0 0 0	0 23 0	0 86 0	0 85 0	0 57 0	0 58 0	0 42 0	0 42 0	0 17 0	0 14	
00:00			3,6	-	0,8	0,0	0,3		0,2		0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
:40	0 4 0	0 0 0	0 99 0	0 0,0 0	0 21 0	0 01 0	0 29 0	0 0 0	0 42 0	0 0 0	0 22 0	0 86 0	0 86 0	0 58 0	0 58 0	0 42 0	0 44 0	0 17 0	0 13	

Annexes

					01																																	
					-																																	
00:00				3,3	0,0	0,8		0,3		0,2		0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2																		
:45	0	4	0	0	0	01	0	01	0	21	0	0	0	3	0	0	0	42	0	0	0	21	0	87	0	87	0	6	0	59	0	42	0	44	0	17	0	13
00:00				3,5	0,0	0,8	0,0	0,3		0,2	0,0	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2																		
:50	0	4	0	0	0	23	0	01	0	23	0	01	0	31	0	0	0	43	0	01	0	2	0	88	0	88	0	6	0	59	0	43	0	44	0	17	0	14
00:00	3,6			3,6	0,0	0,8		0,3		0,2		0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2																		
:55	0	99	0	0	0	99	0	01	0	27	0	0	0	3	0	0	0	44	0	0	0	2	0	89	0	88	0	62	0	59	0	43	0	44	0	17	0	15
00:01				0,0	3,0	0,0	0,8	0,0	0,3		0,2		0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2																		
:00	0	4	0	03	0	97	0	01	0	23	0	01	0	31	0	0	0	43	0	0	0	22	0	9	0	89	0	62	0	59	0	44	0	43	0	17	0	14
00:01				0,0	3,1	0,0	0,8	0,0	0,3		0,2		0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2																		
:05	0	4	0	01	0	55	0	01	0	22	0	01	0	31	0	0	0	43	0	0	0	23	0	91	0	9	0	63	0	6	0	43	0	43	0	17	0	14
00:01				3,0	0,0	0,8		0,3		0,2		0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2																		
:10	0	4	0	0	0	46	0	01	0	23	0	0	0	33	0	0	0	44	0	0	0	25	0	93	0	9	0	63	0	61	0	43	0	44	0	17	0	14
00:01				3,1	0,0	0,8		0,3		0,2	0,0	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2																		
:15	0	4	0	0	0	55	0	01	0	24	0	0	0	32	0	0	0	45	0	01	0	28	0	93	0	9	0	63	0	61	0	43	0	44	0	17	0	14
00:01	3,2			3,2	0,0	0,8		0,3		0,2		0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2																		
:20	0	22	0	0	0	22	0	01	0	22	0	0	0	33	0	0	0	46	0	0	0	3	0	93	0	91	0	63	0	62	0	43	0	43	0	18	0	14
00:01	3,5			3,3	0,0	0,8		0,3		0,2		0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2																		
:25	0	23	0	0	0	01	0	01	0	23	0	0	0	35	0	0	0	47	0	0	0	29	0	93	0	92	0	63	0	62	0	44	0	43	0	19	0	15
00:01				3,1	-	0,8		0,3		0,2		0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2																		
:30	0	4	0	0	0	55	0	0,0	0	23	0	0	0	34	0	0	0	47	0	0	0	3	0	94	0	93	0	63	0	62	0	44	0	44	0	19	0	15

Annexes

00:00:30	0	0,635	0	0,646	0	0,845	0	1,738	0	1,2	0	1,6
00:00:35	0	0,634	0	0,647	0	0,845	0	1,735	0	1,199	0	1,6
00:00:40	0	0,635	0	0,648	0	0,843	0	1,738	0	1,202	0	1,66
00:00:45	0	0,635	0	0,647	0	0,844	0	1,74	0	1,2	0	1,66
00:00:50	0	0,635	0	0,647	0	0,846	0	1,735	0	1,199	0	1,6
00:00:55	0	0,635	0	0,647	0	0,848	0	1,735	0	1,199	0	1,67
00:01:00	0	0,635	0	0,647	0	0,849	0	1,742	0	1,199	0	1,66
00:01:05	0	0,635	0	0,648	0	0,85	0	1,735	0	1,198	0	1,6
00:01:10	0	0,635	0	0,648	0	0,851	0	1,738	0	1,199	0	1,66
00:01:15	0	0,635	0	0,647	0	0,85	0	1,735	0	1,199	0	1,66
00:01:20	0	0,635	0	0,649	0	0,85	0	1,735	0	1,199	0	1,66
00:01:25	0	0,634	0	0,648	0	0,849	0	1,73	0	1,199	0	1,66
00:01:30	0	0,634	0	0,648	0	0,849	0	1,733	0	1,199	0	1,65
00:01:35	0	0,635	0	0,648	0	0,849	0	1,724	0	1,2	0	1,66
00:01:40	0	0,635	0	0,648	0	0,848	0	1,728	0	1,203	0	1,66
00:01:45	0	0,635	0	0,648	0	0,846	0	1,733	0	1,201	0	1,66
00:01:50	0	0,634	0	0,647	0	0,846	0	1,735	0	1,201	0	1,66
00:01:55	0	0,635	0	0,648	0	0,846	0	1,733	0	1,201	0	1,66
00:02:00	0	0,635	0	0,649	0	0,845	0	1,733	0	1,2	0	1,67
Time	?	0,4 F	?	F1	?	F2	?	F3	?	Title #5	?	Title #6
00:00:00	0	1,863	0	1,007	0	1,154	0	1,39	0	1,717	0	1,83
00:00:05	0	1,876	0	1,01	0	1,147	0	1,395	0	1,728	0	1,84
00:00:10	0	1,879	0	1,009	0	1,156	0	1,398	0	1,721	0	1,84
00:00:15	0	1,873	0	1,009	0	1,148	0	1,4	0	1,724	0	1,85
00:00:20	0	1,876	0	1,01	0	1,143	0	1,401	0	1,719	0	1,85
00:00:25	0	1,879	0	1,011	0	1,141	0	1,401	0	1,71	0	1,85

Annexes

00:00:30	0	1,883	0	1,01	0	1,141	0	1,397	0	1,706	0	1,8
00:00:35	0	1,873	0	1,009	0	1,141	0	1,397	0	1,712	0	1,85
00:00:40	0	1,87	0	1,008	0	1,141	0	1,401	0	1,719	0	1,8
00:00:45	0	1,863	0	1,008	0	1,143	0	1,399	0	1,726	0	1,86
00:00:50	0	1,873	0	1,009	0	1,145	0	1,398	0	1,721	0	1,87
00:00:55	0	1,879	0	1,01	0	1,151	0	1,397	0	1,721	0	1,86
00:01:00	0	1,879	0	1,011	0	1,146	0	1,396	0	1,719	0	1,87
00:01:05	0	1,883	0	1,01	0	1,144	0	1,397	0	1,726	0	1,8
00:01:10	0	1,883	0	1,008	0	1,144	0	1,395	0	1,726	0	1,86
00:01:15	0	1,879	0	1,007	0	1,145	0	1,396	0	1,719	0	1,8
00:01:20	0	1,873	0	1,009	0	1,146	0	1,396	0	1,719	0	1,86
00:01:25	0	1,886	0	1,008	0	1,143	0	1,398	0	1,717	0	1,86
00:01:30	0	1,889	0	1,007	0	1,145	0	1,397	0	1,712	0	1,86
00:01:35	0	1,889	0	1,007	0	1,148	0	1,399	0	1,714	0	1,8
00:01:40	0	1,889	0	1,007	0	1,15	0	1,398	0	1,717	0	1,87
00:01:45	0	1,896	0	1,007	0	1,151	0	1,396	0	1,717	0	1,8
00:01:50	0	1,9	0	1,006	0	1,151	0	1,397	0	1,712	0	1,87
00:01:55	0	1,9	0	1,006	0	1,148	0	1,397	0	1,714	0	1,87
00:02:00	0	1,9	0	1,007	0	1,148	0	1,396	0	1,712	0	1,87