### الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية وزارة التعليم العالى و البحث العلمى

Université Ferhat Abbas Sétif 1 Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie



جامعة فرحات عباس، سطيف 1 كلية علوم الطبيعة و الحياة

### **DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE**

N°\_\_\_\_/SNV/**2014** 

## MÉMOIRE

Présenté par

## **HOUCHI Selma**

Pour l'obtention du diplôme de

## **MAGISTER EN BIOLOGIE**

## Spécialité: BIOCHIMIE

## THÈME

## Les Métallo-Beta-Lactamases

## -Recherche de souches bactériennes productrices

## -Essais d'inhibition de l'activité enzymatique relative par trois flavonoïdes commerciaux et deux extraits de *Terminalia chebula*

Soutenue publiquement le ....../......../2014

### DEVANT LE JURY

Président	Belhattab Rachid	Pr UFA Sétif 1
Directeur	Mahdadi Rachid	MCA UFA Sétif 1
Examinateurs	Bouzidi Abdelouahab	Pr UFA Sétif 1
	Sahli Farida	Pr CHU Sétif

Laboratoire de Biochimie Appliquée



Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut... Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, L'amour, le respect, la reconnaissance... Aussi, c'est tout simplement que



Je dédie ce Mémoire ... A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, que dieu le garde dans son vaste paradis,

## Mon Père.

A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur;

## Ma mère

Aux personnes qui m'ont énormément aidée et Pour leur soutien morale et leurs sacrifices le long de ma formation;

## Mes très chers frères

A celles qui m'ont toujours aidée, écoutée, soutenue et encouragée tout au long de mon parcours; celles qui ont toujours été présentes pour moi,

## Mes très chères tantes.

À ceux qui ont plus particulièrement assuré le soutien affectif de ce travail: ma famille HOUCHI ainsi que la famille MAIZA.





## Remerciements



Je remercie DIEU le tout puissant de m'avoir donnée la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire.

Je souhaiterais adresser mes premiers remerciements à mon exemple de rigueur et de droiture dans l'exercice de la profession, le docteur **Rachid MAHDADI**, maitre de conférence à l'université Ferhat Abbas sétif-1, Faculté SNV, pour m'avoir encadré pendant ces années. Je le remercie de ses conseils avisés, sa présence, ses encouragements, son soutien scientifique et humain, et de la liberté de recherche qu'il à bien voulu me laisser.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à monsieur *Rachid BELHATTAB*, professeur à l'université Ferhat Abbas sétif-1 et chef de département de Biochimie, Faculté SNV, pour ses conseils, et son aide ainsi que pour sa gentillesse et sa disponibilité. C'est un grand plaisir pour moi qu'il ait accepté de présider le jury de mon mémoire, je le remercie pour le temps consacré à cet effet en dépit de toutes les responsabilités qu'il a.

Je prends aussi un réel plaisir à remercier chaleureusement Mon professeur **Abdelouahab BOUZIDI**, qui m'a guidée et patiemment conseillée. Qu'il soit assuré de tout mon respect et de toute ma reconnaissance. Je le remercie aussi d'accepter de rapporter mon mémoire.

Je remercie du fond du cœur la personne sans laquelle la réalisation de ce travail aurais été impossible, M<sup>me</sup> **Farida SAHLI**, professeur et chef de service de bactériologie au niveau du CHU de Sétif. Je la remercie aussi d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je ne peux oublier de remercier, mon professeur Hammama BOURICHE. Je suis ravie d'avoir connu une personne aussi humaine, aussi gentille et aussi agréable que lui. Je la remercie pour tout l'intérêt et l'aide qu'elle apportée à mon travail, ainsi qu'à ma vie personnelle. Elle fera toujours partie de personnes que je n'oublierai jamais.

Un remerciement particulier va à Naouel BOUSSOUALIM et Saoussen KADA, pour leur aide qu'elles n'hésitèrent jamais à me proposer dans les moments difficiles. Je n'oublierai jamais qu'ils ne m'ont jamais refusé une demande; je les remercie du fond du cœur.

Un grand merci au professeur AMERA, chef de département de physiologie animal qui a assuré la continuité de ce travail au sein de laboratoire de physiologie animal.

Je tiens à remercier également tous les membres du laboratoire de Biochimie appliquée, particulièrement : **Pr. Lekhmici ARRAR.** 

Je remercie parmi les personnes que j'ai rencontrées dans ce laboratoire, **Pr. CHAREF** pour sa très grande gentillesse, sa disponibilité et ses conseils. **Dr HAICHOUR** pour son aide, ses qualités humaines et son sourire.

Ma chance ne s'arrête pas là et je tiens à remercier également mon professeur : **TEMAMNA Azedine** maitre-assistant classe A à l'université Ferhat Abbas setif-1.

Mes remerciements vont bien évidemment à mon professeur de la langue chinoise **Rawiya KOUACHI** ainsi que l'ensemble du personnel de l'administration du centre de l'enseignement intensif des langues de l'université Setif-2 (el-Hidhab), et plus spécialement à monsieur **Mohamed BERRAHAL** et M<sup>me</sup> **Akila MAYOUF**, et à tous mes amis de groupe.

Je souhaite exprimer également mes remerciements ainsi que ma profonde gratitude au directeur de l'école ORGANEVA, Mon professeur : **Djed NABTI** qui m'a accordé sa confiance en me permettant d'être parmi ses formidables étudiants, je le remercie pour la formation de délégué médicale. Sa compétence et sa grande connaissance dans le domaine des médicaments m'ont été d'une grande utilité pour ce travail.

Je ne pourrais pas bien sur finir sans remercier mon professeur de l'informatique M<sup>me</sup> Samia CHARAMA, pour sa sympathie et son aide. Ainsi que tous le personnel de l'Institut National de Formation Professionnel.



### Abstract

Four extracts were prepared: one aqueous, one methanolic, are from dried fruits of Terminalia chebula and two semi-purified extracts of beta-lactamases, one from a strain of Acinetobacter baumannii and the other from Pseudomonas aeruginosa (clinical isolates), identified among eight others by the CDT test as producing metallo and serine beta-lactamases, respectively. Quantitative and qualitative analyzes show that the first two are rich in polyphenols (513.094±3.061 and 496±2.856 µg GAE/mg, respectively) and flavonoids (39.866±0.469 and 37.261±0.272 µg QE /mg, respectively); the last two are rich in proteins (7.9 and 8.9 mg/ml, respectively). The semi-purified extract of beta-lactamases from Acinetobacter baumannii, hydrolyzes imipinem ( $K_M = 57.52 \mu M$ ,  $Vm = 47.62 \mu mol/mg/min$ ), its enzymatic activity is sensitive to EDTA ( $IC_{50} = 3.98 \text{ mM}$ ), hydrolyzes cephaloridin much more than benzylpenicillin; beta-lactamases contained therein could be so metallo-beta-lactamases type, 3c class. It is inhibited competitively by morin, aqueous and methanolic extracts from dried fruit of T.chebula  $(IC_{50}= 23.28 \mu M, 18.45 \text{ and } 19.68 \mu g/ml, \text{ in order})$ , non-competitively by myrecitin and rutin  $(IC_{50} = 26.39 \text{ and } 39.71 \ \mu\text{M}$ , respectively). The second extract from P.aeruginosa does not hydrolyze the imipinem, its enzymatic activity is insensitive to clavulanic acid, EDTA and NaCl and hydrolyzes cephaloridin much more than benzylpenicillin; beta-lactamases contained herein could be so serine beta-lactamases type, C class. It is inhibited competitively by morin, rutin, methanolic and aqueous extracts of dried fruits T.chebula (IC<sub>50</sub> = 30, 21.03  $\mu$ M, 7.04 and 12.07  $\mu$ g/ml, respectively); non-competitively by myrecitin (IC<sub>50</sub> = 27.10  $\mu$ M). The comparison of IC<sub>50</sub> of the three flavonoids to those of methanolic and aqueous extracts from dried fruit of T.chebula, assume that they are rich in flavonoids much closer to that of morin structure. The test demonstrated the antagonist or potentiating effects shows that the methanolic extract potentiates relatively the effect of imipenem on the growth of A.baumannii.

Key words: Metallo-beta-lactamases, Imipenem, Flavonoids, Terminalia chebula

ملخص

تم تحضير أربع مستخلصات: مستخلصين ميثانولي و مائي بدءا من طحين ثمار جافة من Terminalia chebula (هليلج) و مستخلصين نصف نقيين من بيتالاكتاماز، احدهما بدءا من سلالة من أمستخلصين نصف نقيين من بيتالاكتاماز، و الأخر بدءا من سلالة من Pseudomonas aeruginosa (عزلات سريرية)، محددة من بين ثمانية أخرى باختبار CDT، على أنها مفرزة لبيتالاكتاماز بموقع نشط بفلز و لبيتالاكتاماز بموقع نشط بسيرين، على التوالي. بينت التحاليل الكمية و النوعية أن الأول و الثاني غنيان بعديدات الفينول ( 2.856±496 و 3.061±513 ميكروغرام مكافيء حمض غاليك/مغ، على التوالي) و الفلافونويدات (0.272±0.261 و 0.496±39.866، ميكروغرام مكافيء كرستين/مغ، على التوالي)؛ و الثالث و الرابع غنيان بالبروتينات (7.9 و 8.9 مغ/مل مستخلص انزيمي خام). يميه المستخلص نصف النقى لبيتالاكتاماز بدءا من A.baumannii المضاد الحيوي اميبينام (ثا.ميخائيليس=57.52 ميكرومولار و سرعة قصوى = 47.62 ميكرومول/مغ/د)، نشاطه الانزيمي حساس له EDTA (التركيز المثبط له 50% = 3.98 ميليمولار)، يميه اكثر السيفالوريدين مقارنة بالبنزيلبينيسيلين، و بالتالي يحتمل أن تكون بيتالاكتاماز المحتواة فيه من النوع : مميهة الحلقة بيتالاكتام بموقع نشط بفلز، قسم 3c. يثبط تنافسيا بمورين و بالمستخلصين الميثانولي و المائي (التركيز المثبط لـ 50% = 23.28 ميكرومولار 18.45 و 19.68 ميكروغرام/مل، على الترتيب) و لا تنافسيا بميريستين و روتين (التركيز المثبط لـ 50% = 26.39 و 39.71 ميكرومولار، على الترتيب). لا يميه المستخلص نصف النقى للبيتالاكتاماز بدءا من P.aeruginosa المضاد الحيوي اميبينام، نشاطه الانزيمي غير حساس للحمض كلافولانيك و لـ EDTA و لـ NaCl، لكن يميه اكثر سيفالوريدين مقارنة ببنزيلبينيسيلين، و بالتالي يحتمل أن تكون بيتالاكتاماز المحتواة فيه من النوع : مميهة الحلقة بيتالاكتام بموقع نشط بأيون سيرين قسم C. يثبط تنافسيا بمورين و روتين و بالمستخلصين الميثانولي و المائي (التركيز المثبط لـ 50% =30 ، 21.03 ميكرومولار، 7.04 و 12.07 ميكروغرام/مل، على الترتيب) و لا تنافسيا بميريستين (التركيز المثبط ل 50% = 27.10 ميكرومولار، على الترتيب). تبين المقارنة بين تراكيز الفلافونويدات المثبطة لـ 50% و المستخلصين النباتيين أن هاذيين الأحيرين غنيين بفلافونويدات ببني أكثر تشابها ببني مورين. بين اختبار استبيان تأثير معزز أو معيق أن المستخلص الميثانولي يعزز نسبيا تأثير المضاد الحيوي اميبينام على نمو العزلة A.baumannii.

الكلمات المفاتيح: بيتالاكتاماز بفلز، اميبينام، الفلافونويدات، Terminalia chebula .

### Résumé

Quatre extraits sont préparés : deux extraits, l'un aqueux et l'autre méthanolique à partir de fruits secs de Terminalia chebula et deux extraits semi-purifiés de betalactamases, l'un à partir d'une souche Acinetobacter baumannii et l'autre à partir d'une souche Pseudomonas aeruginosa (isolats cliniques) identifiées, parmi huit autres, par le test CDT comme productrices de métallo et de sérine-betalactamases, dans l'ordre. Les analyses quantitatives et qualitatives montrent que les deux premiers sont riches en polyphénols (513.094±3.061 et 496±2.856 µg GAE/mg, respectivement) et en flavonoïdes (39.866±0.469 and 37.261±0.272 µg QE /mg, respectivement). Les seconds sont riches en protéines (7.9 et 8.9 mg/ml d'extrait, respectivement). L'extrait semi-purifié de betalactamases à partir de A.baumannii hydrolyse l'imipenème ( $K_M = 57.52 \mu M$ ,  $Vm = 47.62 \mu mol/mg/min$ ), son activité enzymatique est sensible à l'EDTA (IC50 = 3.98mM), hydrolyse beaucoup plus la céphaloridine que la benzylpenicilline; la ou les betalactamases y contenues peuvent être donc du type MBL classe 3c. Il est inhibé compétitivement par la morine, et par les extraits méthanolique et aqueux de fruits secs de *T.chebula* (IC<sub>50</sub> = 23.28  $\mu$ M, 18.45 et 19.68  $\mu$ g/ml, respectivement) et non compétitivement par la myrécitine et la rutine (IC<sub>50</sub> = 26.39 et 39.71  $\mu$ M, respectivement). Le second extrait à partir de *P.aeruginosa* n'hydrolyse pas l'imipenème, son activité enzymatique est insensible à l'acide clavulanique, à l'EDTA et au NaCl et hydrolyse beaucoup plus la céphaloridine que le benzylpenicilline. La ou les betalactamases y contenues peuvent être du type SBL classe C. Il est inhibé compétitivement par la morine, la rutine et les extraits méthanolique et aqueux de fruits secs de T.chebula (IC<sub>50</sub> = 30, 21.03  $\mu$ M, 7.04 et 12.07  $\mu$ g/ml, respectivement) et non compétitivement par la myrécitine (IC<sub>50</sub> = 27.10  $\mu$ M). La comparaison des IC<sub>50</sub> des trois flavonoïdes a ceux des extraits méthanolique et aqueux de fruits secs de T.chebula supposent que ceux-ci sont riches en flavonoïdes de structure beaucoup plus proche à celle de la morine. Le test de mise en évidence d'effets potentialisateur ou antagoniste montre que l'extrait méthanolique potentialise relativement l'effet de l'imipenème sur la croissance de A.baumannii.

Mots clés: Metallo-beta-lactamase, Imipenème, Flavonoïdes, Terminalia chebula.

## LISTE DES ABREVIATIONS

AIM	Adelaide IMipenmase
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 Heart Infusion
BSA	Albumine Sérique Bovine
CBBL	Classe <b>B</b> Beta-Lactamase
CDT	Combined Disc Test
CphA	Cephalosporinase
DIM	Dutch IMipenemase
EDTA	Acide Ethylène Diamine Tétraacétique
Е. А	Extrait Aqueux
E. M	Extrait Méthanolique
FEZ	Fluoribacter Endogenous Zinc beta-lactamase
FIM	Florence IMipenmase
GIM	German IMipenemase
GOB	Chryseobacterium meninGO septicum classe B
ImiS	Imipénèmase de Aeromonas Sobria
IMP	<b>IM</b> iPénème
IND	INDologene Métallo-Bêta-Lactamase
КНМ	Kyorin Hospital Metallo-enzyme
L1	Beta-Lactamase

L2	Beta-Lactamase
MBL	Métallo-Bêta-Lactamase
NDM	New Delhi Métallo-Bêta-Lactamase
SBL	Serine Bêta-Lactamase
SFB	Shewanella Frigidimarina classe B
Sfh	Serratia fonticola carbapenem hydrolase
SIM	Seoul IMipénémase
SPM	Sao Paulo Metallo-enzyme
ТМВ	Tripoli Métallo-Bêta-Lactamase
VIM	Vérona Integro-encoded Métallo-Bêta-Lactamase

## SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
<b>REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	
I. LES METALLO-BETA-LACTAMASES	2
I.1. Historique	2
I.2. Terminologie et définition	3
I.3. Classification	3
I.3.1. Principales caractéristiques des MBLs des groupes 3a, 3b et 3c	4
I.3.2. Principales caractéristiques des MBLs des sous-classes B1, B2 et B3	4
I.4. Structure	5
I.4.1. Structure moléculaire commune	5
I.4.2. Différence de structure	6
I.4.3. Structure du site actif	8
I.5. Mécanisme d'action	10
I.6. Inhibiteurs	11
I.7. Epidémiologie	13
II. LES SERINE BETA-LACTAMASES	14
II.1. Classification	14
II.2. Structure	14
II.3. Mécanisme d'action	16
II.4. Inhibiteurs	16
III. LES FLAVONOIDES	17
III.1. Activittés	17
III.1. 1. Propriétés complexantes	17
III.1.1.1. Complexation réversible	17
III.1.1.2. Complexation irréversible	19
III.1. 2. Inhibition d'enzymes	19
III.2. Flavonoïdes utilisés	19
III.2. 1. Morine hydrate	19
III.2. 2. Myrécitine	20
III.2. 3. Rutine trihydrate	20
IV. Terminalia Chebula	21

## **MATERIEL ET METHODES**

I. MATERIEL	23
I.1. Matériel biologique	23
I.1.1. Les bactéries	23
I.1.2. Matériel végétal	23
II. METHODES	23
II.1. Détection phénotypique de métallo-beta-lactamases par le test CDT	23
II.2. Préparations des extraits bruts	24
II.2.1. Extrait brut méthanolique de fruits de Terminalia chebula	24
II.2.2. Extrait brut aqueux de fruits de <i>Terminalia chebula</i>	24
II.2.3. Extrait semi-purifié de beta-lactamases	25
II.3. Analyses quantitatives	26
II.3.1. Analyses quantitatives des polyphénols dans les extraits bruts de <i>Terminalia chebula</i>	25
II.3.2. Analyses quantitatives des flavonoïdes dans les extraits bruts de <i>Terminalia chebula</i>	26
II.3.3. Analyse quantitative des protéines dans l'extrait semi-purifié de betalactamases	27
II.4. Détermination du type de beta-lactamases	27
II.5. Mises en évidence des classes de beta-lactamases	28
II.6. Essais d'inhibition de l'activité enzymatique par trois flavonoïdes de commerce et deux extraits de fruits secs de Terminalia chebula	30
II.6.1. Mise en évidence d'un éventuel effet inhibiteur	30
II.6.2. Mise en évidence du type d'inhibition	30
II.7. Recherche d'un éventuel effet potentialisateur de l'activité antibiotique de l'imipenème par les extraits de fruits secs de <i>Terminalia chebula</i>	31

## **RESULTATS ET DISCUSSIONS**

I-RESULTATS	33
I.1. Détection phénotypique de métallo-beta-lactamases par le test CDT	32
I.2. Analyses quantitatives des extraits bruts	34
I.2.1 Extrait brut de fruits secs de Terminalia chebula	34
I.2.1.1 Rendement	34

I.2.1.2 Analyses quantitatives des polyphénols	34
I.2.1.3 Analyses quantitatives des flavonoïdes	34
I.2.2. Extraits semi-purifiés de beta-lactamases	36
Analyse quantitative des protéines	36
I.3. Détermination du type de beta-lactamases	37
I.4. Mise en évidence des classes	37
I.5. Essais d'inhibition de l'activité enzymatique par trois flavonoïdes de commerce et	
deux extraits de fruits secs de Terminalia chebula	41
I.5.1. Mise en évidence d'un éventuel effet inhibiteur	41
I.5.2. Mise en évidence du type d'inhibition	43
II.6. Recherche d'un éventuel effet potentialisateur de l'activité antibiotique de l'imipenème par les extraits de fruits secs de <i>Terminalia chebula</i>	47
II. DISCUSSIONS	47
II.1. Détection phénotypique de Métallo-Beta-Lactamases	47
II.2. préparation des extraits bruts de fruits secs de <i>T.chebula</i> et analyse quantitative des	
polyphénols et des flavonoïdes	49
II.3. préparation des extraits semi-purifiés de beta-lactamases et analyse quantitative des protéines	50
II.4. Détermination du type de beta-lactamases	50
II.5. Mise en évidence des classes de beta-lactamases	51
II.6. Essais d'inhibition de l'activité enzymatique	52
II.7 Recherche d'un éventuel effet potentialisateur de l'activité antibiotique de l'imipenème par les extraits de fruits secs de <i>Terminalia chebula</i>	53

## LISTE DES TABLEAUX

**Tableau. 4:** Rendements (%) d'extraction par macération et par décoction et teneurs en polyphénols (μg

**Tableau. 7:** les valeurs de  $K_M$  ( $\mu$ M flavonoïdes ou  $\mu$ g/ml extraits), des Vm ( $\mu$ mol/mg/min) d'hydrolyse de concentrations croissantes de céphaloridine par 10 $\mu$ l d'extrait semi-purifié à partir de *A.baumannii* et de *P.aeruginosa* en absence et en présence de concentration fixe de morine hydrate, de myrécitine, de rutine trihydrate, d'extraits aqueux ou méthanolique de fruits secs de *T.chebula.* .....47

**Tableau. 8 :** Diamètre des zones d'inhibitions (mm) par l'extrait aqueux (1500µg) ou l'extrait méthanolique (1500µg) seuls et avec l'imipenème (10µg) de la croissance des bactéries testées......**48** 

## LISTE DES FIGURES

Figure.1 : Structure monomérique d'une MBL de <i>Aeromonas hydrophila</i> (CphA), reconstitué en rubans
Figure.2: Structure tétramirique d'une MBL de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (L1) reconstitué en rubans
<b>Figure. 3 :</b> (A) : La structure reconstituée d'une metallo-beta-lactamase 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
<b>Figure. 4 :</b> (A) : La structure reconstituée d'une metallo-betalactamase classe B1, forme bi-nucléaire ( <i>Bacillus cereus</i> II); (B): schéma du site actif indiquant les acides aminés coordonnés au premier ion zinc et le deuxième avec leurs positions
Figure. 5 : Mécanisme d'hydrolyse des betalactames par une MBL de la sous-classe B1 (BCII mononucléaire) proposé par Karsisiotis et ses collaborateurs. (1) : mécanisme de formation du complexe de Mechaelis, (2) : mécanisme de clivage de la liaison C-N du cycle beta-lactames (ouverture du cycle), (3) : dissociation du complexe produit- enzyme.12
<b>Figure. 6</b> : Mécanisme d'hydrolyse des betalactames par une MBL de la sous-classe B1 (BCII bi- nucléaire) proposé par Karsisiotis et ses collaborateurs. (1) : mécanisme de formation du complexe de Mechaelis, (2) : mécanisme de clivage de la liaison C-N du cycle beta-lactames (ouverture du cycle), (3) : dissociation du complexe produit-enzyme
Figure. 7: Epidémiologie mondiale des MBLs 13
Figure. 8 : La structure reconstituée d'une serine-beta-lactamase classe A (SHV-1)15
Figure. 9 : La structure reconstituée d'une serine-beta-lactamase classe D (OXA-1)15
<b>Figure. 10:</b> Mécanisme d'hydrolyse des betalactames par une SBL de claasse (A) proposé par Sabbagh (1998). (1) : mécanisme de formation du complexe de Mechaelis, (2) : acylation de l'enzyme et mécanisme de clivage de la liaison C-N du cycle beta-lactames, (3) : dissociation du complexe produit- enzyme
Figure. 11: Mécanisme de l'inhibition d'une serine betalactamase (SHV-1) par l'acide clavulanique
Figure. 12: Structure de la Morine hydrate ( $C_{15}H_{10}O_7.H_2O$ ).20
Figure. 13: Structure de la Myrécitine ( $C_{15}H_{10}O_8$ )20
Figure. 14: Structure de la Rutine trihydrate ( $C_{27}H_{30}O_{16}H_2O$ ).21
Figure. 15 : arbre de <i>T.chebula</i> (A), ses fruits mûrs frais (B), secs (C) et broyat de ceux-ci (D)
<b>Figure. 16 :</b> les zones d'inhibitions de la croissance des bactéries testées cultivées sur Gélose Mueller Hinton, après 16 à 18 h d'incubation en présence d'imipenème seul (10μg) et d'imipenème (10μg) plus EDTA (1900 μg)
<b>Figure.17 :</b> Droite d'étalonnage tracé en fonction des concentrations croissantes d'acide gallique et des absorbances relatives à 765nm (Moyenne ± SD de trois mesures) <b>35</b>

## Introduction

### **INTRODUCTION**

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 beta-lactamines sont à juste titre les antibiotiques les plus prescrits en médecine générale à cause de leur efficacité thérapeutique et leur tolérance.

Cependant, sous la pression de ces antibiotiques, les bactéries n'ont cessé de développer des mécanismes afin de survivre en présence de ceux-ci, c'est la résistance bactérienne aux antibiotiques. Celle-ci constitue un phénomène leur permettant de s'adapter aux conditions hostiles de leur environnement. Il existe plusieurs mécanisme de résistance, parmi lesquelles la production d'enzymes appelées beta-lactamases (capables d'hydrolyser l'anneau  $\beta$ -lactame). Grâce à la grande plasticité du génome bactérien (plasmide ou transposon), le caractère de résistance par ce mécanisme peut passer d'une bactérie déjà résistante à une autre ce qui permet d'acquérir de nouvelles propriétés par gain d'information génétique nouvelle codant pour la production de beta-lactamases.

À la fin de l'an 2009, le nombre de séquences de protéines uniques pour les betalactamases dépassé 890. Ces enzymes sont divisées en deux grands groupes, les serine betalactamases et les métallo-beta-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-betalactamases 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 carbapenèmes, qui ne sont pas dégradables par la plupart des sérine-β-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-beta-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-beta-lactamase à partir d'un isolat clinique de *Acinetobacter baumannii* par trois flavonoïdes de commerce et par deux extraits bruts de polyphénols, l'un méthanolique et l'autre aqueux de fruits secs de *Terminalia chebula*. En fait, Le choix de ces molécules revient à leur tolérance et leur faible toxicité sur l'organisme, à leur capacité de complexer les ions métalliques. Le choix de la plante revient à sa richesse en polyphénols.



# bíblíographíque

## I. LES METALLO-BETA-LACTAMASES

### I.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* à Gram positif (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 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 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 relatives propriétés fonctionnelles à savoir l'activité carbapenèmase et l'insensibilité aux inhibiteurs classiques de beta-lactamases à serine (acide clavulanique, acide penicillanique 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'imipenème. Cette activité revient, en fait, à une enzyme chromosomique inductible et n'est active qu'en présence du zinc. Pour ces chercheurs il s'agit d'une métallo-enzyme qu'ils ont désignée beta-lactamase 1 (L1) (Saino *et al.,* 1982).

L'existence de cette activité imipenèmase n'est confirmée qu'à partir du début des années 90, lorsqu'on a publié en 1991 qu'une souche de *Pseudomonas aeruginosa* isolée au Japan (Bush, 1998; Zubair *et al.*, 2011) en 1988 était résistante à l'imipenème 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-betalactamase fut ensuite identifiée dans certaines entérobactéries (*Klebsiella pneumoniae*). D'autres MBL du type IMP

et VIM, GIM-1, KHM-1, IND-1 ... et dernièrement (en 2009) la New Delhi Métallobetalactamase (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.

### I.2. Terminologie et définition

Les métallo-beta-lactamases sont connues par de nombreux termes : (i) les métallo-betalactamases (MBL) parce qu'elles nécessitent un métal pour agir sur le noyau lactame des betalactamines (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'Ambler (Galleni *et al.*, 2001); (iv) les béta-lactamases du groupe trois parce qu'elles sont efficaces sur les carbapenèmes; (v) les carbapénèmases parce qu'elles sont efficaces sur les carbapenèmes (Imipenème, Ertapenème, Doripenème, Meropénème).

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

### I.3. Classification

La classification des beta-lactamases, types confondues, la plus admise actuellement est celle d'Ambler. Elle constitue la première classification séparant les métallo-beta-lactamases des serine beta-lactamases. Le premier type y est regroupé dans une seul classe appelée classe B; le second type est y regroupé en trois classes appelées classe A, C et D en se basant sur la structure moléculaire (Ambler, 1980). En 1989, Bush avait proposé une autre classification dans laquelle il séparait également les métallo-beta-lactamases des serine 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 en trois sous-groupes : groupe 3a, groupe 3b et le groupe 3c sur la base de leurs capacités à

hydrolyser les imipenèmes 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 (Brown *et al.*, 2011), et des structures de leurs sites actifs.

### I.3.1. 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 imipenèmes. Les céphalosporines sont également bien hydrolysées par ces enzymes, mais pas aussi bien que les imipenèmes.

Groupe 3b: ce sont les vrais carbapenèmases 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).

### I.3.2. 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) (Carfi *et al.*, 1995; Galleni *et al.*, 2001), IMP (Riccio *et al.*, 2001), et de *P aeruginosa*, VIM, GIM et SPM-1...

**Sous-classe B2:** par comparaison aux enzymes de la sous classes B1, les enzymes de cette sousclasse 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. 1**), cette sous-classe comprend les MBLs tétramériques (Walsh *et al.*, 2005). A titre d'exemple nous citons celles produites par : *Stenotrophomonas maltophilia* (L1), le *C.meningosepticum* (GOB), *Legionella gormanii* (FEZ-1), *Marcescen Serratia* (SMB-1) (Wachino *et al.*, 2013).

### I.4. Structure

#### I.4.1. 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 sousclasse 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 sousclasses 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'aminoacides hautement conservés entre les membres de la sous-classe B1 (His116, His118, Asp120, Thr142, Gly193, His196, Asp199, Asn200, Val202, Leu217, Gly219, Gly220, Cys221, Gly232, Trp244, His263 et Thr303) et 16 résidus entre les membres de la sous-classe B3 (Pro45, Gly56, Thr57, Gly79, Gly103, Asp108, His118, Asp120, His121, Ala134, Gly149, Gly183, Gly195, His196, Gly199 et His263). Plus précisément, les 17 résidus conservés de la sous-classe B1 existent dans le domaine C-terminal alors que les 16 résidus conservés de la sous-classe B3 existent dans le domaine N-terminal (Rossolini et Docquier, 2007)

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

Malgré la faible analogie de leurs structures primaires, toutes les MBLs connues présentent une structure tertiaire de type  $\alpha\beta/\beta\alpha$  composée de deux feuillets  $\beta$  centraux et cinq hélices  $\alpha$  périphériques. Selon Rossolini et Docquier (2007), les structures tertiaires de neuf MBLs dont six de la sous-classe B1, un de la sous-classe B2 et deux de la sous-classe B3, ont été étudiées par la méthode X-ray cristallographie. Toutes ces MBLs présentent la même structure tertiaire en sandwich (ou en pli) de type  $\alpha\beta/\beta\alpha$  (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 et Adolph, 2004); leur site actif se trouve dans le sillon peu profond à l'interface des deux domaines  $\alpha\beta$  (Majiduddin *et al.*, 2002). Toutes les structures de MBLs présentent un pli global similaire avec des feuillets et des hélices dans l'ordre suivant:  $\beta1\beta2\beta3\beta4$  ( $\beta5$ )  $\alpha1\beta5$  ( $\beta6$ )  $\alpha2\beta6$  ( $\beta7$ )  $\alpha3$  pour le domaine N-terminal et ( $\beta7$ )  $\beta8$   $\beta9$   $\beta10$   $\beta11$   $\alpha4$   $\beta12$   $\alpha5$  pour le domaine C-terminal (Rossolini et Docquier, 2007). La structure quaternaire de la plupart des MBLs est monomèrique. À notre connaissance, la seule MBL qui fait l'exception à cette règle est la L1, dont la structure quaternaire est homotétramèrique (**Fig. 2**) (Rossolini et Docquier, 2007; Hu *et al.*, 2008).

### I.4.2. Différence de structure

Il existe des différences structurelles entre les enzymes des différentes sous-classes relatives à l'architecture moléculaire et à la structure du site actif. Les enzymes de la sous-classe B3 présentent une taille moléculaire supérieure à celles des autres sous-classes en raison de la grande taille de leur polypeptide (entre 25 et 30 kDa). Les résidus d'acides aminés supplémentaires sont essentiellement logés dans les feuillets  $\beta 10$  et  $\beta 11$  et l'hélice  $\alpha 5$  du domaine C-terminal, dans la boucle qui joint les domaines N-terminal et C-terminal et la terminaison N (dans l'enzyme L1). Les enzymes de la sous-classe B2 diffèrent des membres des autres sous-classes par: (i) la présence d'une hélice  $\alpha 3$  allongée, qui est situé juste au-dessus de la poche du site actif, (ii) l'absence de boucles mobiles (entre  $\beta 3$  et  $\beta 4$  dans les membres de la sous classe B1 ou entre  $\alpha 3$  et  $\beta 7$  dans ceux de la sous classe B3) à proximité du site actif (Rossolini et Docquier, 2007).



**Figure.1 :** 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. 2 : Structure tétramirique 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).

#### I.4.3. Structure du site actif

Les MBLs possèdent généralement un site actif constitué de résidus d'acides aminés coordonnés à un ou à deux ions zinc. MBLs confondues, ces acides aminés sont fréquemment l'asparagine, la cystéine et trois à cinq histidines. Dans la sous-classe B1, le site actif peut être mononucléaire, autrement dit les acides aminés établissent des liaisons avec un seul ion de zinc. Il peut être également bi-nucléaire, autrement dit les acides aminés établissent des liaisons avec deux ions de zinc. Dans le cas du site mono-nucléaire, les acides aminés établissant des liaisons avec le seul ion zinc sont trois résidus histidines (Fig.3). Dans le cas du site bi-nucléaire, les acides aminés établissant des liaisons avec le premier ion zinc sont trois histidines; avec le deuxième ion zinc sont des résidus d'asparagine, de cystéine et d'histidine (Abriata et al., 2008) (Fig.4). Dans la classe B2, le site actif est toujours du type mononucléaire. Les acides aminés établissent des liaisons avec le seul ion de zinc sont des résidus d'asparagine, de cystéine et d'histidine (Page et Badarau, 2008). En fin, dans la classe B3, le site actif peut être mono ou binucléaires. 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 Zn1ou 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. 3 :** (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. 4 :** (A) : La structure reconstituée d'une métallo-beta-lactamase de la sous-classe B1, forme binucléaire (*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).

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

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

\*BBL : Beta-Lactamase classe B

### I.5. Mécanisme d'action

Bien que l'exigence des ions métalliques dans l'hydrolyse des antibiotiques betalactamines par les MBLs soit encore un sujet de débat, plusieurs mécanismes catalytiques ont été proposés pour les MBLs de site actif mono et binucléaires. Dans ce qui suit nous nous limiterons au mécanisme catalytique proposé par Abriata et ses collaborateurs (2008) dans le cas d'une MBL de classe B1 (BCII), une MBL d'un site actif qui peut être mono ou bi-nucléaire (Breece et al., 2012). Dans le cas du site actif mono-nucléaire, les principales étapes du mécanisme catalytique sont : (i) la formation du complexe de Michaëlis: le OH de l'eau déprotoné par le résidu asparagine 120, établie une liaison avec l'ion Zn et attaque le carbone du carbonyle du cycle beta-lactame. Ceci entraine la formation d'un complexe intermédiaire tétraédrique chargé négativement. Les quatre liaisons établies par l'ion zinc servent de stabilisateur de cet intermédiaire. (ii) la catalyse: Le résidu Asp120 fait don d'un proton à l'azote du cycle beta-lactame entrainant le clivage de la liaison C-N de ce cycle et son ouverture. (iii) libération du produit : le clivage de liaison C-N du cycle beta-lactame ionise le carbone du carbonyle du même cycle lui permettant d'établir une double liaison avec l'oxygène chargé du complexe intermédiaire formé à la suite de la première étape. Ceci est soldé par la libération du produit et du site actif de l'enzyme (De Seny et al., 2002) (Fig.5).

Dans le cas du site actif bi-nucléaire, les principales étapes du mécanisme catalytique sont toujours les mêmes : (i) la formation du complexe de Michaelis : l'ion hydroxyl de pontage Zn1-Zn2 est responsable de l'attaque nucléophilique, qui aboutit à un intermédiaire chargé négativement. (ii) la catalyse: La molécule d'eau apicale liée au zinc est positionnée de manière optimale à donner un proton à l'azote entrainant le clivage de la liaison C-N de cycle beta-lactame et son ouverture. (iii) libération du produit: le clivage de liaison C-N du cycle beta-lactame ionise le carbone du carbonyle du même cycle lui permettant d'établir une double liaison avec l'oxygène chargé du complexe intermédiaire formé à la suite de la première étape. L'ion hydroxyde nouvellement formé du Zn2 laisse la place à une molécule d'eau pour se lier au Zn1 suivie de la dissociation du produit à partir du site actif de l'enzyme (Gonzalez *et al.,* 2007 ; Abriata *et al.,* 2008) (**Fig. 6**).

### **I.6. Inhibiteurs**

Les métallo-beta-lactamases ne sont pas inhibées par les inhibiteurs classiques de serine beta-lactamases: l'acide clavulanique, le tazobactam et le sulbactam (Chakraborty et al., 2012). En plus, et jusqu'à ce jour, il n'y a aucun inhibiteur de MBLs de potentiel thérapeutique démontré (Simm et al., 2005; kim et al., 2011 ; Vella et al., 2011 ; Zhu et al., 2013) parmi les inhibiteurs expérimentaux trouvés, ceci en raison de leurs toxicités (Borra, 2012). Ces inhibiteurs peuvent être: (i) des composés qui modifient l'enzyme de façon covalente irréversible; à titre d'exemple, il s'agit de p-chloromercuribenzoate (Bush, 1989), de l'acide iodoacétique (Payne, 1993), de l'acide thioglycolique (Payne et al., 1997)..., (ii) des composés qui chélatent le zinc coordonné au site actif, ce qui entraîne l'inactivation réversible de l'enzyme, tels que l'EDTA, le 1, 10-phénanthroline, l'acide dipicolinique, deux phénazines de Streptomyces sp, le bis (1Ntetrazol-5-yl) amine (Toney et al., 1999) et l'EGTA (Laraki et al., 1999), ou (iii) des composés qui inhibent de façon compétitive la liaison du substrat, soit par imitation de la structure du substrat β-lactame soit par coordination avec l'ion zinc coordonné au site actif (Simm et al., 2005). Ces derniers composés comprennent les tétrazoles biphényles (Toney et al., 1998), les dérivés de l'acide mercaptophényl acétique (Payne, 1993), de l'acide thiomandelique (Mollard et al., 2001; karsisioti et al., 2013) et les dérivés thioxocéphalosporines (Tsang et al., 2004 ; Faridoon et Islam, 2013).



**Figure. 5** : Mécanisme d'hydrolyse des beta-lactames par une MBL de la sous-classe B1 (BCII mononucléaire) proposé par Karsisiotis et ses collaborateurs. (1): mécanisme de formation du complexe de Mechaelis, (2): mécanisme de clivage de la liaison C-N du cycle beta-lactames (ouverture du cycle), (3): dissociation du complexe produit-enzyme (Karsisiotis *et al.*, 2014).



**Figure. 6**: Mécanisme d'hydrolyse des betalactames par une MBL de la sous-classe B1 (BCII binucléaire) proposé par Karsisiotis et ses collaborateurs (2014). (1) : mécanisme de formation du complexe de Mechaelis, (2): mécanisme de clivage de la liaison C-N du cycle beta-lactames (ouverture du cycle), (3): dissociation du complexe produit-enzyme (Karsisiotis *et al.*, 2014).

### I.7. Epidémiologie

L'intérêt accru pour les 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 (**Fig. 7**). 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. 7: Epidémiologie mondiale des MBLs (Cornaglia et al., 2011).

### **II. LES SERINE BETA-LACTAMASES**

### **II.1.** Classification

Selon Ambler, les serine beta-lactamases sont groupées en trois classe A, C et D (Ambler 1980).

**Classe A:** Elle comprend des pénicillinases et des céphalosporinases inductibles, chromosomiques ou plasmidiques; et fortement sensibles à l'acide clavulanique. Elles sont généralement caractérisées par un poids moléculaire (PM) moyen de 29 KDa et un point isoélectrique point Isoelectrique (pI) variable de 5,4 à 8.2 (Philippon *et al.*, 1998)

**Classe C:** Elle est constituée de céphalosporinases, chromosomiques ou plasmidiques, insensibles à l'effet inhibiteur de l'acide clavulanique et de l'EDTA. Elles sont généralement caractérisées par un PM moyen de 40 KDa et un pI variable compris entre 7 et 9 (Gautier, 2007).

**Classe D:** c'est la classe des oxacillinases, le plus souvent plasmidiques, peu sensibles aux inhibiteurs classiques, inhibées par le NaCl (Poirel et Nordmann, 2002). Le PM des enzymes de cette classe est très variable (23 à 40 KDa) et le pI peut varier de 6 à 8,6 (Boussoualim *et al.*, 2011).

### **II.2.** Structure

Les serine beta-lactamases sont toutes des protéines globulaires monomériques. Leur structure secondaire comprend 11 hélices  $\alpha$  et 5 feuillets  $\beta$ . Leur structure tertiaire comprend à son tour deux domaines, un tout en hélice, l'autre un mélange d'hélice  $\alpha$  et de feuillets  $\beta$  alternées. Toutes les serine beta-lactamases possèdent une structure tertiaire en sandwich du type  $\alpha/\alpha\beta$ . Le site actif se trouve dans l'espace existant entre les deux domaines de la structure en sandwich (**Fig. 8, 9**).

La comparaison des structures primaires des serine betalactamases montre l'existence d'amino-acides de fonction et ou de nature conservée entrant dans la composition de quatre éléments formant le site actif de ces enzymes (**Tab. 2**). L'élément 1 est une tétrade d'acide aminé: lys-X-X-ser ou X est un acide aminé variable. L'élément 2 est une triade d'acide aminé: Asp-X-tyr (classe C et D) ou Asn-Asp-Ser. L'élément 3 est une triade également: Gly-thr-Lys. L'élément 4 est formé d'un seul acide aminé, le glutamate. Confondus, ils participent directement ou indirectement dans l'hydrolyse du beta-lactamine (Charlier *et al.*, 1998).



**Figure. 8 :** La structure reconstituée d'une serine beta-lactamase classe A (SHV-1) (Drawz et Bonomo, 2010).



**Figure. 9 :** La structure reconstituée d'une serine beta-lactamase classe D (OXA-1) (Drawz et Bonomo, 2010).

Las classas		Les éle	éments	
	1	2	3	4
А	KXXS	NDS / SDS	KTG / KRS	E
С	KXXS	YXN	KTG	n.d*
D	KFTS	YAN	KTG	n.d*

**Tableau.2:** les résidus d'acides aminés des éléments conservés du site actif des trois sousclasses SBLs (Charlier *et al.*, 1998).

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

### II.3. Mécanisme d'action

Les serine beta-lactamases catalysent le clivage de la liaison amide du cycle betalactame par l'intermédiaire d'un résidu serine de leur site actif dans une réaction de trois étapes. Dans une première étape, l'enzyme et le beta-lactamine interagissent pour constituent le complexe non-covalent de Michaelis-Menten. Dans une deuxième étape dite étape d'acylation, suite à une attaque nécleophilique du carbonyle du cycle  $\beta$ -lactame par le groupement hydroxyle de l'acide aminé serine, il se forme un complexe acyl-enzyme covalent. Dans une troisième étape dite étape de désacylation, l'intervention d'une molécule d'eau préalablement activé ou déprotoné par un acide aminé qui peut être un lysine, ou glutamate, ou un tyrosine, entraine la dissociation du complexe acyl-enzyme et formation de composés acides tels que l'acide pénicilloïque ou l'acide céphalosporoïque qui a titre indicatif sont inactifs (**Fig. 10**) (Sabbagh, 1998; Chen et Herzberg, 2000; Minasov *et al.*, 2002).

### **II.4. Inhibiteurs**

Les inhibiteurs de serine beta-lactamases sont nombreux. Parmi ceux-ci, trois sont de potentiels thérapeutiques démontrés, il s'agit de l'acide clavulanique, du sulbactame et du tazobactame. Les trois sont des analogues de beta-lactamines et inhibent irréversiblement (inhibiteurs suicides) ces enzymes (Padayatti *et al.*, 2005). Le mécanisme de cette inhibition le plus simple est celui de l'acide clavulanique. Celui-ci est reconnu par les serine beta-lactamases comme un beta-lactamine et est hydrolysé entant que tel. Cette reconnaissance conduit à la formation du complexe de Micheilis-Menten et par la suite du complexe intermédiaire acyle-
enzyme. Cependant, cette acylation catalytique initiale de la serine 70 est suivie par une séquence de réactions qui emprisonne un deuxième résidu serine 130 dans le site actif. Cette modification de la sérine 130 et par conséquent du site actif, signifie que celui-ci reste bloqué même après que la serine 70 soit libérée par hydrolyse (**Fig. 11**) (Palmer *et al.*, 2014).

## **III. LES FLAVONOIDES**

Les flavonoïdes sont des pigments naturels répandus dans tout le règne végétal, et y existe sous forme libre ou conjugué à des oligosides. Ils interviennent comme agent protecteur contre les rayons ultra-violets et les organismes pathogènes. Ils font partie des polyphénols, principaux métabolites secondaires des végétaux. Ils sont apportés au niveau de l'organisme grâce à la consommation des fruits, des légumes, des céréales, du miel...

### III.1. Activités

#### **III.1.1. Propriétés complexantes**

Cette propriété peut être réversible ou irréversible.

#### III.1.1.1. Complexation réversible

Les flavonoïdes complexent réversiblement un grand nombre de molécules et de biomolécules telles que les phénols (phénomène de co-pigmentation), les protéines comme l'albumine sérique, les polysaccharides en particulier les cyclodextrines ou l'ADN. Cette complexation peut se produire grâce aux groupements phénoliques via des liaisons hydrogènes, des interactions électrostatiques et grâce aux noyaux aromatiques via des interactions de Vander Waals et des effets hydrophobes (Anthoni, 2007).

#### **III.1.1.2.** Complexation irréversible

A notre connaissance seule les flavonoïdes contenant une fonction cathécol dans leur structure est capable de complexer d'une façon irréversible les molécules. L'irréversibilité de cette complexation revient au caractère oxydable de cette fonction cathécol. Dans le cas de complexation des protéines, les liaisons chimiques s'établissant lors de la complexation entre ces biomolécules et ces flavonoïdes sont des liaisons covalentes. Ils se forment des ortho-



**Figure. 10**: Mécanisme d'hydrolyse des betalactames par une SBL de claasse (A) proposé par Sabbagh, 1998. (1) : mécanisme de formation du complexe de Mechaelis, (2) : acylation de l'enzyme et mécanisme de clivage de la liaison C-N du cycle beta-lactames, (3) : dissociation du complexe produit-enzyme (Sabbagh, 1998).



**Figure. 11**: Mécanisme de l'inhibition d'une serine betalactamase (SHV-1) par l'acide clavulanique (Palmer *et al.*, 2014).

quinones pouvant réagir avec les groupements nucléophiles, amines et les thiols des protéines (Walle *et al.*, 2003).

Les flavonoïdes contenant une partie cathécol dans leur structure forment aussi des complexes stables avec des métaux de transition (Fe<sup>3+</sup>, Al<sup>3+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>); la stœchiométrie du complexe et le site de chélation dépendent de la nature du flavonoïde (présence de partie catéchol) (Le Nest *et al.*, 2004) et du pH (Anthoni, 2007).

#### III.1.2. Inhibition d'enzymes

Les flavonoïdes possèdent un large spectre d'activité inhibitrice. De nombreuses enzymes de mécanismes catalytiques différents sont en fait inhibées par ces molécules. Il s'agit d'hydrolases, d'oxydoréductases, d'ADN synthétases, d'ARN polymérases, des phosphatases, des protéines kinases, d'oxygénases, d'amino-acide oxydases (Havsteen, 2002)...

### III.2. Flavonoïdes utilisés

#### III.2.1. Morine hydrate

La morine hydrate ou 2',3,4',5,7 pentahydroxyflavone, est un isomére de la quercétine (le modèle d'hydroxylation sur l'anneau B, qui est méta) (**Fig. 12**) (Gopal, 2013). La morine est un composé organique de la famille des flavonols, jaune naturellement abondant dans les branches de *Morus alba* L (mûrier blanc) et les vins rouges. Elle possède des activités pharmacologiques et biologiques intéressantes tels que : l'activité anti-inflammatoire, l'activité anticancéreuse l'inhibition de la xanthine oxydase, l'effet protecteur de l'ADN contre les dommages causés par les radicaux libres, la prévention de l'oxydation des lipoprotéines de faible densité (Gopal, 2013; Singha Roy *et al.*, 2014).



Figure. 12: Structure de la morine hydrate (C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>7</sub>.H<sub>2</sub>O) (Singha Roy *et al.*, 2014).

#### III.2.2. Myrécitine

La myrécitine ou 3,3',4',5,5',7 hexahydroxyflavone (**Fig. 13**) ou myricétol est un composé organique de la famille des flavonols, également. Il est naturellement présent dans de nombreux types de végétaux, en particulier dans les raisins, le vin rouge, les oignons, les baies (Sowa *et al.*, 2014).

La myricétine possède des propriétés antioxydantes, anti-tumoral et anti-inflammatoire (Zhong *et al.*, 2014).



Figure. 13: Structure de la myrécitine C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>8</sub> (Sowa *et al.*, 2014).

#### III.2.3. Rutine trihydrate

La rutine est un quercétine conjugué au rhamnose d'où le nom quercetin-3-rhamnosyl glucoside, (**Fig. 14**). Dans le milieu naturel, il est abondamment présent dans les légumes, les fruits, le thé, le vin. Il est doué d'activités biologiques et pharmacologiques importantes : anti-inflammatoires, anti-cancéreux et anti-oxydantes (Jang *et al.*, 2014).



Figure. 14: Structure de la rutine trihydrate (C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>16</sub>.H<sub>2</sub>O) (Savic *et al.*, 2013).

## IV. Terminalia chebula

*Terminalia chebula* est un arbre caducifolié atteignant 30 m de haut avec un fut généralement court et cylindrique atteignant jusqu'à 10 m de long et 80-130 cm de diamètre. Cette plante se reconnaît à ses fruits à noyaux mesurant deux à quatre centimètres, qui ressemblent à des olives vertes lorsqu'ils sont mûrs. Séchés, ils rappellent plutôt les noix de muscade; toutefois, leur couleur varie entre le noir, le brun-orangé et le jaune (Prakash *et al.*, 2012). Il appartient à la famille des combretacées (Dharmaratne *et al.*, 2013). Cet arbre pousse dans les régions tropicales chaudes de l'Asie (Inde, Népal, Thailande...) de l'Afrique (Côte d'Ivoire, Cango, Tanzanie...) (Deepack *et al.*, 2010). Il est connu sous plusieurs noms folklorique: le myrobolan chébule et le bhishakpriya (le nectar favori), Haritaki (Fruit sacré de Shiva) (Rath et Pathy, 2014), Samor thai (Rangsriwong *et al.*, 2009). Dans les pays arabes il est connu sous le nom "el halilej" (**Fig.15**).

Les propriétés médicinales de *Terminalia chebula* ont été rapporté dans un hadith charif "عليكم بالهليلج الأسود فاشربوه ، فإنه شجرة من شجر الجنة ، طعمه مر وهو شفاء من كل داء". De nombreuses études ont montré que des extraits de *Terminalia chebula* notamment de ses fruits sont doués d'innombrables activités biologiques et pharmacologiques : activité antivirale, antibactérienne, activité inhibitrice importante du stress oxydatif, anti-vieillissement cellulaire, activités antidiabétique, cardioprotecteur, anti-ulcer, anti SIDA, anticancéreuse, diurétique... (Sancheti *et al.*, 2010 ; Rath *et al.*, 2014). Les composés phénoliques les plus inhibiteurs d'enzymes étant les acides chébulinique, tannique et éllagique, gallique et le 3 galloyl-glucoses. A titre d'exemple les deux dernières molécules inhibent l'intégrase du virus d'immunodéficience humaine de type 1 (HIV-1) et certain enzymes de la glycolyse des bactéries salivaires et pourrait servir d'agent anti-carries (Chang et Lin, 2012).



Figure.15: arbre de *T.chebula* (A), ses fruits mûrs frais (B), secs (C) et broyat de ceux-ci (D).

# Matériel et

# méthodes

## I. Matériel

### I.1. Matériel biologique

#### I.1.1. Les bactéries

Dix souches bactériennes ont été isolées entre 2012 et 2013 à partir des échantillons pathologiques et identifiées au niveau des laboratoires de microbiologie du CHU de Sétif (4 souches : *Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae et Escherichia coli*), de l'hopital d'El-eulma (2 souches : *Pseudomonas aeruginosa*) et de l'hopital de Biskra (4 souches : *Klebsiella pneumoniae, Serratia marcescens*, deux souches *Escherichia coli*). Ces souches, ont été conservées dans des milieux de conservation à +4°C jusqu'à utilisation.

#### I.1.2 Matériel végétal

Il s'agit de fruits secs de *Terminalia chebula*, plante appartenant à la Famille des *Combretacea*, achetés chez un phytothérapeute de la ville de Sétif. Ces fruits sont conservés à l'abri de la lumière à une température ambiante jusqu'à utilisation. Leur identification comme étant des fruits de *Terminalia chebula* a été faite au niveau du laboratoire du département de Biologie et d'Ecologie Végétale, Université Ferhat Abbas, Sétif 1; par le professeur LAOUAR Hocine.

## **II. Méthodes**

### II.1. Détection phénotypique de métallo-beta-lactamases par le test CDT

#### • Principe

Les métallo-beta-lactamases sont des carbapenemases 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 (Combined Disk Test Imipenème-EDTA) est réalisé selon Yong *et al* (2002). Des colonies bactériennes de *A.baumanni* ou de *P.aeruginosa* en phase de croissance ont été transférées dans des tubes contenant de l'eau physiologique jusqu'à l'obtention d'une turbidité voisine à celle de Mc Farland 0.5. Par la suite, des surfaces entières de la gélose Mueller

Hinton préalablement coulé dans des boites de pétri ont été ensemencées par cette suspension microbienne par la technique d'écouvillonnage. Deux disques espacés de 25mm contenant chacun 10µg d'imipenème ont été appliqués sur le milieu, et une quantité de 1900 µg d'EDTA (0.5M, pH 8) (Junsei Chemical, Tokyo, Japon) a été ajouté par la suite à l'un d'eux.

#### • Expression des résultats

Après 16 à 18 h d'incubation à 35 ° C, les diamètres des zones d'inhibition sont notés en millimètre (mm).

#### II.2. Préparations des extraits bruts

#### II.2.1. Extrait brut méthanolique de fruits secs de Terminalia chebula

Suivant le protocole d'extraction décrit par Motamed et Naghibi (2010). Un broyat de 30 g de fruits secs de *Terminalia chebula* est rajouté progressivement à 300 ml d'un mélange méthanol/eau (8:2 v/v). Après 24h d'agitation à température ambiante et à l'ombre, le mélange est filtré sur papier filtre; le filtrat est soumis à une évaporation sous pression réduite à l'aide d'un rotavapeur (Büchi) pour éliminer le méthanol. Le résidu obtenu constitue notre extrait brut méthanolique après élimination de l'eau par séchage. Celui-ci est conservé à l'abri de la lumière dans des flacons fermés à -20°C jusqu'à utilisation.

#### II.2.2. Extrait brut aqueux de fruits secs de Terminalia chebula

Trente grams de broyat de fruit secs de *Terminalia chebula* sont mis à bouillir pendant 20 min dans 300 ml d'eau distillé. Le mélange est filtré puis centrifugé 3000g pendant 10min. Le résidu obtenu après séchage du surnageant constitue notre extrait brut aqueux. Celui-ci est conservé à l'abri de l'humidité dans des flacons fermés à -20°C jusqu'à utilisation (Ljubuncic *et al.*, 2005).

#### • Expression des résultats

Les rendements sont calculés par application de la formule suivante :

**R** (%) = 100 x M <sub>ext</sub>/M <sub>éch</sub>, où : **R** est le rendement en %; M <sub>ext</sub> est la masse en grammes au terme de l'extraction et M <sub>éch</sub> est la masse sèche en grammes de l'échantillon.

#### II.2.3. Extrait semi-purifié de beta-lactamases

Deux extraits semi purifiés de beta-lactamases ont été préparés, l'un à partir de la souche *Acinetobacter baumannii* et l'autre à partir de la souche de *Pseudomonas aeruginosa* qui se sont avérées selon les résultats du test CDT, productrices de métallo-beta-lactamases et de serine beta-lactamases, respectivement.

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 erlen de 11 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 A.baumannii ou de P.aeroginosa puis incubées à 37°C pendant 18 h sous agitation. L'inoculum obtenu est utilisé pour ensemencer les cinq herlen restantes à raison de 50 ml d'inoculum par erlen. Après addition de 50 µg d'imipenème à chaque herlen (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 (centrifugeuse Hettich EBA 20) pendant 15 min. les culots cellulaires récupérés dans du tampon phosphate (0.1M, pH 7) sont homogénéisées par des ultrasons de 60 kHz de fréquence (12 cycles de sonication alterné de bain de glace de 30 seconde chacun) à l'aide d'un sonicateur (vibra-cell 50W/60Hz). Les homogéinats obtenues sont centrifugées (centrifugeuse ROTINA 35 R) à 20 000 g pendant 30 minutes à 4C°. Les surnageant obtenus sont poolés. Le pool est agité pendant 1 h en présence de 2% (concentration finale) de sulfate de streptomycine (sigma aldrich, Allemagne) pour complexer les acides nucléiques. Le mélange est recentrifugé à 20 000 g pendant 50 minutes à 4°C pour précipiter ces acides nucléiques. Le surnageant est ensuite dialysé contre le tampon phosphate (0.1M, pH 7) pendant 24h. Le dialysat, concentré par incubation avec le polyéthylène glycol, 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.

#### **II.3.** Analyses quantitatives

# II.3.1. Analyses quantitatives des polyphénols dans les extraits bruts de fruits secs de *Terminalia chebula*

• Principe

Cette analyse est réalisée par la méthode de Folin-Ciocalteu, décrite par Vuorela (2005) et améliorée par Li et ses collaborateurs (2007). Le principe consiste en la réduction des acides phosphotungstique et phosphomolybdique du réactif de Folin-Ciocalteu en présence de

polyphénols en un mélange bleu d'oxydes de tungstène et de molybdène. La coloration bleue produite absorbant à 765 nm est proportionnelle au taux de composés phénoliques oxydés.

#### • Mode opératoire

A des concentrations finales croissantes du standard acide gallique (10 à 180  $\mu$ g/ml) (Sigma Aldrich, Allemagne) et à des volumes appropriés de solutions d'extraits de fruits secs de *T.chebula* dans du DMSO/eau (2/8 v/v), est rajouté à chacune 1 ml de réactif de Folin-Ciocalteu (Sigma Aldrich, Allemagne). Après 4 minutes d'incubation, 800  $\mu$ l de carbonate de sodium (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 75 g/l) sont ajoutées. Après agitation et une deuxième incubation pendant 2 heures à l'obscurité et à température ambiante, les absorbances des mélanges sont déterminées à 765 nm (spectrophotomètre GENESYS<sup>TM</sup> 20).

#### • Expression des résultats

Les résultats sont déterminés à partir de la courbe d'étalonnage tracé en fonction des concentrations d'acide gallique et des absorbances relatives. Ils sont exprimés en µg équivalent d'acide gallique par mg d'extrait (µg EAG/mg d'extrait).

# II.3.2. Analyses quantitatives des flavonoïdes dans les extraits bruts de fruits secs de *Terminalia chebula*

#### • Principe

Les teneurs en flavonoïdes des deux extraits de fruits secs de *T.chebula* sont déterminées par la méthode du trichlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>) (Bahorun *et al.*, 1996) amélioré par Djeridane et ses collaborateurs (2006) dont le principe est : Le trichlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>) forme un complexe très stable avec les groupements hydroxydes OH des flavonoïdes. Ce complexe jaune absorbe à 430 nm; L'absorbance est proportionnelle à la quantité des flavonoïdes.

#### • Mode opératoire

A des concentrations finales croissantes du standard quercétine (2 à 16  $\mu$ g/ml) et à des volumes appropriés de solutions d'extraits de fruits secs de *T.chebula* dans du DMSO/eau (2/8 v/v), est rajouté a chacune 1 ml du trichlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub> : 2%). Après agitation et incubation pendant 30 min à l'obscurité et à température ambiante, les absorbances des mélanges sont déterminées à 430 nm.

#### • Expression des résultats

Les résultats sont déterminés à partir de la courbe d'étalonnage tracé en fonction des concentrations de la quercétine et des absorbances relatives. Ils sont exprimés en microgramme équivalent de quercétine par milligramme d'extrait (µg EQ/mg d'extrait).

# II.3.3. Analyse quantitative des protéines dans les extraits semi-purifiés de betalactamases

#### • 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 <u>nm</u>, proportionnellement à la quantité de protéines existante.

#### Mode opératoire

A des concentrations finales croissantes d'albumine sérique bovine (0,1 à 2 mg/ml) et à des volumes appropriés d'extraits de beta-lactamases semi-purifiés, est rajouté à chacune 2 ml de réactif de Macart composé de 0,004 % (p/v) de bleu brillant de Coomassie G 250, 4 % (v/v) d'éthanol à 96 %, 0,003 % (p/v) SDS et 10 % (v/v) d'acide phosphorique à 85 %. 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.

#### II.4. Détermination du type de beta-lactamases

Les beta-lactamines souvent utilisés comme substrats de beta-lactamases, absorbent dans l'ultraviolet (235-320 nm). La perte de ce caractère en présence de ces enzymes est mise à profit dans la détermination du type de beta-lactamases.

#### • Mode opératoire

Les beta-lactamines utilisés comme substrat dans cette étude sont: la pénicilline G ( $\epsilon_{235nm}$ = 560M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>); la céphaloridine ( $\epsilon_{260nm}$  = 1000 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>), l'imipenem ( $\epsilon_{299nm}$  = 9000 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>) et l'aztreonam ( $\epsilon_{320nm}$  = 700 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>).

En pratique, à des volumes suffisants pour 650  $\mu$ l de tampon Hepes (50 mM; 150mM NaCl ; pH 7,2 ; 5  $\mu$ g BSA/ml, 0.0005% Zn), sont rajoutés des concentrations croissantes finales de pénicilline G (10-100  $\mu$ M), de céphaloridine (10-80  $\mu$ M), d'imipenème (5-120  $\mu$ M) ou d'aztreonam (10-100  $\mu$ M). Après homogénéisation, 10 $\mu$ l d'extrait semi purifié de beta-lactamases sont par la suite rajoutés. Après une deuxième homogénéisation manuelle, l'évolution de l'absorbance des milieux réactionnels est suivie à température ambiante et à 235, 260, 299 et à 320 nm, respectivement (spectrophotomètre Shimadzu UV-1800).

#### • Expression des résultats

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

#### II.5. Mises en évidence des classes de beta-lactamases

Selon Ambler, il existe quatre classes de beta-lactamases: A, B, C et D. Les activités catalytiques des classes A, C et D reviennent essentiellement et communément à l'acide aminé serine de leur site actif d'où l'appellation serine beta-lactamases; celle de la classe B revient essentiellement à un ou deux atome de zinc (cofacteur) d'où l'appellation métallo-beta-lactamases. Les enzymes de la classe A sont fortement inhibées par l'acide clavulanique mais pas par l'EDTA. Les enzymes de la classe B sont, par contre, inhibées par l'EDTA mais pas par l'acide clavulanique. Les enzymes des classes C et D ne sont inhibées ni par l'acide clavulanique ni par l'EDTA. La classe D est par contre inhibé par le NaCl (Poirel et Nordmann, 2002). Ce profil inhibiteur est mis à profit pour mettre en évidence les classes de beta-lactamases contenues dans nos extraits semi-purifiés (Ambler, 1980 ; Gautier, 2007).

#### • Mode opératoire

Dans une première étape, à des volumes suffisants pour 650  $\mu$ l du même tampon Hepes, nous rajoutons des concentrations croissantes d'acide clavulanique (1-50  $\mu$ M); d'EDTA (10-100 mM) ou de NaCl (10-100 mM). Après addition successive de 10 $\mu$ l d'extrait semi purifié de beta-lactamase à partir de *A.baumannii* ou de *P.aeruginosa* et homogénéisation manuelle, et de 80 $\mu$ M (concentration finale) de céphaloridine puis une deuxième homogénéisation manuelle, l'évolution de l'absorbance des milieux réactionnels est suivie à 260nm.

#### • Expression des résultats

Les vitesses initiales de réaction sont à chaque fois notées en  $\Delta A$ /min puis converties en  $\mu$ mol/mg/min. Les résultats sont exprimées en IC<sub>50</sub> (la concentration inhibant 50% de l'activité enzymatique) déterminées à partir de la courbe tracée en fonction de : -Log [molécule ou extrait testé] et de Logit. Le Logit est égale au log naturel du pourcentage d'inhibition que divise 100 moins le pourcentage d'inhibition [logit= Ln (% inhibition / 100- % inhibition)]. Le pourcentage d'inhibition est égal à l'unité moins le rapport vitesse en absence de l'inhibiteur à la vitesse en présence de l'inhibiteur fois 100.

Dans une deuxième étape,  $10\mu l$  d'extrait semi-purifié de beta-lactamase à partir des deux mêmes souches, sont rajoutés à des volumes suffisants pour 650 µl de tampon Hepes contenant une concentration finales proche de l'IC<sub>50</sub> de l'acide clavulanique, de l'EDTA ou du NaCl. Après homogénéisation manuelle, on rajoute de la céphaloridine à des concentrations croissantes finales de 10-80 µM et on suit l'évolution de l'absorbance des milieux réactionnels à 260 nm.

#### • Expression des résultats

Les vitesses initiales de réaction sont à chaque fois notées en  $\Delta A$ /min puis converties en  $\mu$ mol/mg/min. Les valeurs des constantes de Michaelis (K<sub>M</sub>) et des vitesses maximales (Vm ou Activité spécifique) sont déterminés à partir des courbes de lineweaver Burk tracées grâce au logiciel « SIGMAPLOT 12.0 » auquel le module de pharmacologie « Enzyme Kinetics 1.3 » a été ajouté.

# II.6. Essais d'inhibition de l'activité enzymatique par trois flavonoïdes de commerce et deux extraits de fruits secs de *Terminalia chebula*

L'objectif de ces essais est la mise en évidence, en premier lieu, d'un éventuel effet inhibiteur de trois flavonoïdes de commerce (morin hydrate, myricétine, rutine trihydrate) et des deux extraits de fruits secs de *T.chebula* ; et en second lieu le type d'inhibition dans le cas des molécules qui s'avèrent douer d'effet inhibiteur de l'activité enzymatique des deux extraits semi-purifiés de beta-lactamases.

#### II.6.1. Mise en évidence d'un éventuel effet inhibiteur

#### • Mode opératoire

A des volumes suffisants pour 650  $\mu$ l du même tampon Hepes, on rajoute des concentrations croissantes finales de morine (10-100 $\mu$ M), de myrécitine (10-80  $\mu$ M), ou de rutine trihydrate (20-80 $\mu$ M) ou d'extraits de fruits secs de *T.chebula* (5-90  $\mu$ g/ml) préalablement dissouts dans l'eau distillée, dans du DMSO/ Eau (1 :4 v/v) et dans du DMSO/ Eau (1 :10 v/v), dans l'ordre. Après homogénéisation manuelle, 10 $\mu$ l d'extrait semi-purifié de beta-lactamase à partir de *A.baumannii* ou de *P.aeruginosa* sont par la suite rajoutés. Après une deuxième homogénéisation manuelle, on rajoute 80  $\mu$ M (concentration finale) de céphaloridine et on suit l'absorbance du milieu réactionnel à 260 nm.

#### • Expression des résultats

Les vitesses initiales de réaction sont à chaque fois notées en  $\Delta A/min$  puis converties en  $\mu mol/mg/min$ . les résultats sont exprimés en IC<sub>50</sub> déterminées à partir de la courbe logit-log.

#### II.6.2. Mise en évidence du type d'inhibition

#### • Mode opératoire

Dix microlitres d'extraits semi-purifiés de beta-lactamases à partir de *A.baumannii* ou de *P.aeruginosa* sont rajoutés à des volumes suffisants pour 650  $\mu$ l du même tampon Hepes contenant une concentration finales proche de l'IC<sub>50</sub> de morine, de myrécitine ou de rutine trihydrate ou de l'extrait méthanolique ou aqueux de fruits secs de *T.chebula*. Après homogénéisation manuelle, on rajoute de la céphaloridine à des concentrations croissantes finales de 10-80  $\mu$ M et on suit l'évolution de l'absorbance des milieux réactionnels à 260 nm.

#### • Expression des résultats

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

# II.7. Recherche d'un éventuel effet potentialisateur de l'activité antibiotique de l'imipenème par les extraits de fruits secs de *Terminalia chebula*

Des colonies bactérienne de *A.baumanni* ou de *P.aeruginosa* en phase de croissance ont été transférées dans des tubes contenant de l'eau physiologique jusqu'à l'obtention d'une turbidité voisine à celle de Mc Farland 0.5. Par la suite, des surfaces entières de gélose Mueller Hinton préalablement coulé dans des boites de pétri ont été ensemencées par cette suspension microbienne par la technique d'écouvillonnage. Deux disques de commerce contenant chacun  $10\mu g$  d'imipenème ont été appliqués sur ces surface ensemencées ; un de ces deux disques a été supplémenté par la suite de 1500  $\mu g$  d'extraits méthanolique ou aqueux de fruits secs de *T.chebula*, préalablement dissouts dans du DMSO/EAU (1 :10 v/v). Les boîtes sont ensuite incubées pendant 24 h à 37 °C.

Parallèlement à ce test, nous avons réalisés un essai de mises en évidence d'une éventuelle activité anti-bacterienne anti-*A.baumannii* et anti-*P.aeruginosa*. Des disques de 6mm de diamètre de papier wattman stérilisés est supplémentés de 1500  $\mu$ g et 3000  $\mu$ g d'extrait méthanolique ou aqueux de fruits secs de *T.chebula* par disque, ont été appliqués sur des mêmes surfaces de gélose ensemencées. Les boîtes sont ensuite incubées pendant 24 h à 37 °C.

#### • Expression des résultats

Après 24 h d'incubation à 37  $^\circ$  C, les diamètres des zones d'inhibition sont notés en millimètres.

# Résultats et

díscussions

# Résultat et

# díscussions

## I. Résultats

### I.1. Détection phénotypique de métallo-beta-lactamases par le test CDT

La mise en évidence d'une résistance à l'imipenème et la mise en évidence de la disparation de celle-ci, sont réalisées chez dix souches cliniques par le test CDT (Combined Disk Test Imipenème-EDTA) qui consiste en l'incubation de ces dernières en présence d'imipenème seul et d'imipenème plus EDTA. La comparaison des zones d'inhibition obtenues suite à l'application de ce test (**Tab.3**) montre que les souches *Acinetobacter baumannii* (A1) et *Pseudomonas aeruginosa* (P1) isolées et identifiées au niveau du laboratoire de microbiologie du CHU de Sétif, résistent à l'imipenème (diamètre des zones d'inhibition égale à 8 et 12 mm, respectivement) contrairement aux souches restantes (diamètre confondue supérieur à 20mm). Lorsqu'on rajoute de l'EDTA, cette résistance est surmonté par l'imipenème chez les deux premières souches (les zones d'inhibition augmentent presque de trois et de deux fois, respectivement). Chez le reste des souches, les zones d'inhibition demeurent presque les mêmes (**Fig. 16**).

			Diamètre de zone d'inhibition		
code	Souche testée	Source d'obtention	Imipinéme	Imipinéme +	
				EDTA	
<b>P</b> <sub>1</sub>	Pseudomonas aeruginosa	CHU de Sétif	12	24	
$A_1$	Acinetobacter baumannii	CHU de Sétif	8	25.5	
$E_1$	Escherichia coli	CHU de Sétif	30	33	
$\mathbf{K}_1$	Klebsiella pneumoniae	CHU de Sétif	39	42	
$K_2$	Klebsiella pneumoniae	Hôpital de Biskra	42	44.5	
$E_2$	Escherichia coli	Hôpital de Biskra	30	34	
$\mathbf{S}_1$	Serratia marcescens	Hôpital de Biskra	26	29	
E <sub>3</sub>	Escherichia coli	Hôpital de Biskra	38	41	
$P_2$	Pseudomonas aeruginosa	Hôpital d'el Eulma	30	32	
<b>P</b> <sub>3</sub>	Pseudomonas aeruginosa	Hôpital d'el Eulma	29	31	

**Tableau.3 :** Diamètre des zones d'inhibitions (mm) par l'imipenème  $(10\mu g)$  seul et en présence d'EDTA (1900 $\mu g$ ) de la croissance des bactéries testées.



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

#### I.2. Analyses quantitatives des extraits bruts

#### I.2.1 Extrait brut de fruits secs de Terminalia chebula

#### I.2.1.1 Rendement

Deux extraits méthanolique et aqueux ont été préparés chacun à partir de 30 gr de broyat de fruits secs de *T.chebula*, par macération et par décoction, respectivement. Les quantités de l'extrait méthanolique et aqueux étaient de l'ordre de 16.05 et de 17.61 g, dans l'ordre d'où les rendements d'extractions calculés "R" de 53.5 et 58.7 %, respectivement (**Tab. 4**).

#### I.2.1.2 Analyses quantitatives des polyphénols

Les teneurs en polyphénols exprimées en  $\mu$ g EAG/mg d'extraits sont déterminées par la méthode de Folin-Ciocalteu qui consiste en l'incubation de volumes appropriés de solution d'extraits et du standard (acide gallique) avec le réactif de Folin-Ciocalteu et le carbonate de sodium, puis en la lecture de l'absorbance du mélange à 765nm. Les valeurs de ces teneurs sont déterminées à partir de l'équation de la courbe tracée en fonction des concentrations de l'acide gallique et des absorbances relatives. Celle-ci ne passe pas par l'origine (b= +0.027) mais elle est presque linéaire dans l'intervalle de concentration du standard rapporté (R<sup>2</sup> = 0,999) (**Fig. 17**). Ces teneurs sont de l'ordre de 513.094±3.061 et 496±2.856 µg EAG/mg, respectivement dans l'extrait aqueux et l'extrait méthanolique (voir **Tab.4**).

#### I.2.1.3. Analyses quantitatives des flavonoïdes

Les teneurs en flavonoïdes exprimées en  $\mu$ g EQ/mg d'extraits sont déterminées par la méthode de trichlorure d'aluminium qui consiste en l'incubation de volumes appropriés de solution d'extraits et du standard (quercétine) avec le trichlorure d'aluminium, puis en la lecture de l'absorbance du mélange à 430nm. Les valeurs de ces teneurs déterminées à partir de l'équation de la courbe tracée en fonction des concentrations de la quercétine et des absorbances relatives. Celle-ci ne passe pas par l'origine (b= -0.061) mais elle est presque linéaire dans l'intervalle de concentration du standard rapporté (R<sup>2</sup> = 0,997) (**Fig. 18**). Ces teneurs sont de l'ordre de 39.866±0.469 et 37.26±0.272 µg EQ/mg, respectivement, dans l'extrait aqueux et dans l'extrait méthanolique (**Tab. 4**).

**Tableau. 4:** Rendements (%) d'extraction par macération et par décoction et teneurs en polyphénols ( $\mu$ g EAG/mg d'extraits) et en flavonoïdes ( $\mu$ g EQ/mg d'extraits) de fruits secs de *T.chebula*. Les valeurs sont la moyenne de trois essais  $\pm$  SD.

Rendement d'extraction		Teneur en po	lyphénols	Teneur en flavonoids		
Macération	Décoction	Ext.Méthanolique	Ext.Méthanolique Ext. Aqueux		Ext.Aqueux	
53.5	58.7	496±2.856	513.094±3.061	37.261±0.272	39.866±0.469	



**Figure.17 :** Droite d'étalonnage tracée en fonction des concentrations croissantes d'acide gallique et des absorbances relatives à 765nm (Moyenne ± SD de trois mesures).



Figure.18: Droite d'étalonnage tracée en fonction des concentrations croissantes de la quercétine et des absorbances relatives à 430 nm (Moyenne ± SD de trois mesures).

#### I.2.2. Extraits semi-purifiés de beta-lactamases

#### Analyse quantitative des protéines

Deux extraits semi-purifiés de beta-lactamases ont été obtenus à partir d'homogéinats (extraits bruts) de culots cellulaires bactériens de deux isolats cliniques: *A.baumanni* et *P.aeruginosa*, ceci suite à un traitement par la streptomycine, une centrifugation, une dialyse et une concentration de ces extraits bruts.

Les teneurs en protéines exprimées en mg/ml sont déterminées par la méthode de Bradford (1976) améliorée par Macart et Gerbaut (1982) qui consiste en l'incubation d'échantillons des extraits et du standard (BSA) avec le réactif de Macart, puis en la lecture de l'absorbance du mélange à 595nm. Les valeurs de ces teneurs déterminées à partir de l'équation de la courbe tracée en fonction des concentrations de la BSA et les absorbances relatives. Celleci ne passe pas par l'origine (b= -0.026) mais elle est presque linéaire dans l'intervalle de concentration du standard rapporté ( $R^2 = 0,996$ ) (**Fig.19**). Ces teneurs sont de l'ordre de 7.9 et 8.9 mg/ml, respectivement dans l'extrait semi purifié de betalactamase à partir de *A.baumanni* et de *P.aeruginosa*.



Figure. 19 : Droite d'étalonnage tracée en fonction de concentration croissante de BSA et les absorbances relatives à 595 nm (Moyenne ± SD de trois mesures).

#### I.3. Détermination du type de beta-lactamases

Après mise en présence de concentrations croissantes des différents antibiotiques substrats avec 10µl d'extrait semi-purifié à partir de *A.baumanni*i et conversion des vitesses d'hydrolyse relatives de ces substrats (**Fig. 20**), une représentation graphique de Lineweaverburk est réalisée (1/V = f(1/[S]) (**Fig. 21**). les valeurs de la constante de Michaelis-Menten (K<sub>M</sub>) déterminées à partir de l'équation de cette représentation sont 14.92; 15.15; 57.52 µM ; celles des vitesses maximales sont 80.64; 133.33; 47.62 µmol/mg protéine/min, respectivement dans le cas de la pénicilline G, de la céphaloridine et de l'imipenème (**Tab. 5**).

La reproduction du même protocole expérimental avec l'extrait semi-purifié à partir de *P.aeruginosa* (voir **Fig. 20**) montre que celui-ci interagit avec la pénicilline G et la céphaloridine a des constantes de Michaelis-Menten de 20 et 33.33  $\mu$ M et les hydrolyse à des vitesses maximales de 113.63 et 497.51  $\mu$ mol/mg protéine/min, dans l'ordre (voir **Fig. 21** et **Tab. 5**).

#### I.4. Mises en évidence des classes de beta-lactamases

Dans une première étape, et après mise en présence de concentrations fixes d'acide clavulanique, d'EDTA, ou de NaCl avec 10µl d'extrait semi-purifié à partir de *A.baumannii*, et addition, dans chaque cas, de concentrations micro-molaires croissantes finales de céphaloridine, les vitesses d'hydrolyse relatives sont calculées. A partir des représentations graphiques de Lineweaver-burk (**Fig. 22**), les valeurs de la constante de Michaelis-Menten (K<sub>M</sub>) déterminées sont 15.38 et 28.98  $\mu$ M ; celles des vitesses maximales sont 134.13 et 129.52  $\mu$ mol/mg protéine/min, respectivement dans le cas de l'acide clavulanique et de l'EDTA (**Tab. 6**).

Dans une deuxième étape, la reproduction du même protocole expérimental avec l'extrait semi-purifié à partir de *P.aeruginosa* montre que les valeurs de K<sub>M</sub> de celui-ci en présence de l'acide clavulanique ou de l'EDTA ou du NaCl sont : 34.61; 33.51 et  $33.45 \mu$ M; celles des vitesses d'hydrolyse maximales sont: 526.31; 487.80 et  $500 \mu$ mol/mg protéine/min, dans l'ordre (voir **Fig. 22** et **Tab. 6**).



**Figure. 20 :** évolution de l'absorbance de  $80\mu$ M céphaloridine (A-1 ; B-1), de  $100\mu$ M penicilline (A-2 ; B-2) et de  $120\mu$ M imipenème (A-3 ; B-3), en présence de  $10\mu$ l d'extrait semi-purifié à partir de *P.aeruginosa* (A) ou d'extrait semi-purifié à partir de *A.baumannii* (B).







**(B)** 

**Figure.21 :** courbe de lineweaver-burk tracée en fonction de l'inverse des vitesses d'hydrolyses de concentrations micro-molaire finales croissantes de pénicilline G, de céphaloridine et d'imipenème par les deux extraits semi-purifiés à partir de *A.baumannii* (A), et à partir de *Pseudomonas aeruginosa* (B) et l'inverse de concentrations de ces antibiotiques.

Tableau. 5 : valeurs des $K_M$ ( $\mu M$ ) et des Vm ( $\mu mol/mg/min$ ) obtenues dans le cas des extraits semi
purifiées de betalactamases à partir de A.baumanni et de P.aeruginosa. n.d = non déterminé

Antibiotiques	A.baumanni		P.aeruginosa	
substrats	Vm	K <sub>M</sub>	Vm	K <sub>M</sub>
Penicilline G	80.64	14.92	113.63	20
Céphalorédine	133.33	15.15	497.51	33.33
Imipinème	47.62	57.52	n.d	n.d
Aztréonam	n.d*	n.d	n.d	n.d



**Fig. 22:** courbes de lineweaver-burk tracées en fonction de l'inverse des vitesses d'hydrolyses de concentrations micro-molaires finales croissantes de Céphaloridine par l'extrait semi-purifié à partir de *Pseudomonas aeruginosa* (A) en présence ( $\bullet$ ) et en absence ( $\bullet$ ) de concentrations fixes d'acide clavulanique (A-1), d'EDTA (A-2) et de NaCl (A-3) et par l'extrait semi-purifié à partir de *A.baumannii* (B) en présence concentrations fixes d'acide clavulanique (B-1) et d'EDTA (B-2) et l'inverse des concentrations de céphaloridine. La figure (B-3) présente la courbe logit-log, après mise en présence de concentrations milli-molaires finales croissantes d'EDTA avec 10µl d'extrait semi-purifié de betalactamase à partir de *A.baumannii* et addition de 80µM concentrations finales de céphaloridine, et calcule des vitesses d'hydrolyses de celle-ci.

**Tableau. 6:** Valeurs des  $K_M$  et des Vm d'hydrolyses de concentrations micro-molaires croissantes finales de Céphaloridine par 10µl d'extraits semi-purifiés de betalactamase à partir de *A.baumannii* ou de *P.aeruginosa* en présence de concentration fixes d'acide clavulanique ou d'EDTA ou de NaCl.

	Paramètres cinétiques			
	Acinetobacter baumannii		Pseudomonas aeruginosa	
Molécules	Vm (µmol/mg/min)	K <sub>M</sub> (μM)	Vm (µmol/mg/min)	Κ <sub>M</sub> (μM)
aucune	133.33	15.15	497.51	33.33
+ Ac.Clavulanique	134.13	15.38	526.31	34.61
+ EDTA	129.52	28.98	487.80	33.51
+ NaCl	n.d.	n.d.	500	33.45

n.d\* : non déterminé

Dans une troisième étape, après mise en présence de concentrations milli-molaires finales croissantes d'EDTA avec  $10\mu$ l d'extrait semi-purifié de beta-lactamase à partir de *A.baumannii* et addition de  $80\mu$ M concentrations finales de céphaloridine, des vitesses d'hydrolyses de celleci sont déterminées. A partir de la courbe logit-log, la valeur de l'IC<sub>50</sub> de l'EDTA est égale à 3.98 mM. (voir **Fig. 22, B-3**).

# I.5. Essais d'inhibition de l'activité enzymatique par trois flavonoïdes de commerce et deux extraits de fruits secs de *Terminalia chebula*

Les essais ont été réalisées à l'aide de trois flavonoïdes de commerces à savoir la morine hydrate, la myrécitine et la rutine trihydrate, et de deux extraits de fruits secs de *T.chebula*.

#### I.5.1. Mise en évidence d'un éventuel effet inhibiteur

Après la mise en présence de concentrations croissantes finales de morine hydrate ou de myrécitine ou de rutine trihydrate, ou d'extrait aqueux ou méthanolique de fruits secs de *T.chebula* avec 10µl de l'extrait semi-purifié de beta-lactamase de *A.baumanni* et rajout de 80µM céphaloridine (concentration finale), des pourcentages d'inhibitions sont calculés. Les courbes tracées logit-log tracées (**Fig. 23**) montrent que la morine hydrate, la myrécitine, la rutine trihydrate, l'extrait méthanolique ou l'extrait aqueux de fruits secs de *T.chebula* inhibent 50 % de l'activité enzymatique aux concentrations de 23.28, 26.39, 39.71 µM, 18.45, 19.68 µg/ml, dans l'ordre.



**Figure 23 :** les valeurs de concentration inhibant 50% (IC50) de l'activité de l'extrait semi-purifié de beta-lactamases à partir de *A.baumannii* (A) et courbes Logit-Log dans le cas de la [morine hydrate] (a), de la [myrécitine] (b), de la [rutine trihydrate ] (c), de l' [extrait aqueux ] (d), ou de l'[extrait méthanolique ] (e).

Logit-log = inhibition (%) de l'activité de l'extrait semi-purifié de beta-lactamases à partir de *A.baumannii* (A) par les trois flavonoïdes de commerces et les deux extraits que divise (100- inhibition (%))

La reproduction du même essai et dans les mêmes conditions dans le cas de l'extrait semi-purifié de beta-lactamase à partir de *P.aeruginosa*, montrent que la morine hydrate, la myrécitine, la rutine trihydrate, l'extrait méthanolique ou l'extrait aqueux de fruits secs de *T.chebula* inhibent 50 % de l'activité enzymatique aux concentrations de 30, 27.10, 21.03  $\mu$ M, 7.04, 12.07  $\mu$ g/ml, dans l'ordre (**Fig.24**).

#### I.5.2. Mise en évidence du type d'inhibition

Après mise en présence de concentrations fixes proche des IC<sub>50</sub> de morine hydrate ou de myrécitine ou de rutine trihydrate, ou d'extrait aqueux ou méthanolique de fruits secs de *T.chebula* avec 10µl d'extrait semi-purifié à partir de *A.baumannii*, et addition, dans chaque cas, de concentrations micro-molaire croissantes finales de céphaloridine, les vitesses d'hydrolyse relatives sont calculées. A partir des représentations graphiques de Lineweaver-burk (**Fig. 25**), les valeurs de K<sub>M</sub> déterminées sont 25.97, 15.62, 15.49 µM, 30.30 et 29.41 µg/ml ; celles des vitesses maximales sont 125, 65.78, 41.66, 134 et 131.57 µmol/mg proteine/min, respectivement dans le cas de morine hydrate, de myrécitine, de rutine trihydrate, d'extrait aqueux ou méthanolique de fruits secs de *T.chebula* (**Tab. 7**).

Lorsqu'on opère avec l'extrait semi-purifié à partir de *P. aeruginosa* dans les mêmes conditions expérimentales et de calcule, les valeurs de  $K_M$  déterminées sont 34.61, 128.20µM, 108.69 et 75 µg/ml ; celles des vitesses maximales sont 125, 495.04, 512.82 et 498 µmol/mg proteine/min, respectivement dans le cas de morine hydrate, de myrécitine, de rutine trihydrate, d'extrait aqueux ou méthanolique de fruits secs de *T.chebula* (**Fig. 26, Tab.7**).



**(B)** 

**(e)** 

**Figure. 24 :** les valeurs de concentration inhibant 50% (IC50) de l'activité de l'extrait semi-purifié à partir de P.aeruginosa (B) et courbes Logit-Log dans le cas de la [morine hydrate] (a), de la [myrécitine] (b), de la [rutine trihydrate] (c), de l' [extrait aqueux ] (d), ou de l'[extrait méthanolique ] (e).



**Figure. 25 :** courbes de lineweaver-burk tracées en fonction de l'inverse des vitesses d'hydrolyses de concentrations micro-molaire finales croissantes de céphaloridine par l'extrait semi-purifié de *A.baumannii*, en absence ( $\blacklozenge$ ) et en présence ( $\blacksquare$ ) de concentrations fixes de morine hydrate (a), de myrécitine (b), de rutine trihydrate (c), d'extrait aqueux (d), ou d'extrait méthanolique (e) et l'inverse des concentrations de céphaloridine.



**Figure. 26 :** courbes de lineweaver-burk tracées en fonction de l'inverse des vitesses d'hydrolyses de concentrations micro-molaire finales croissantes de céphaloridine par l'extrait semi-purifié de *P.aeruginosa* en absence ( $\blacklozenge$ ) et en présence ( $\blacksquare$ ) de concentrations fixes de morine hydrate (a), de myrécitine (b), de rutine trihydrate (c), d'extrait aqueux (d), ou d'extrait méthanolique (e) et l'inverse des concentrations de céphaloridine.

**Tableau. 7:** les valeurs de  $K_M$  (µM flavonoïdes ou µg/ml extraits), des Vm (µmol/mg/min) d'hydrolyse de concentrations croissantes de céphaloridine par 10µl d'extrait semi-purifié à partir de *A.baumannii* et de *P.aeruginosa* en absence et en présence de concentration fixe de morine hydrate, de myrécitine, de rutine trihydrate, d'extraits aqueux ou méthanolique de fruits secs de *T.chebula*.

	r drametres enterques					
Molécules	Acinetobact	er baumanni	Pseudomonas aeruginosa			
	Vm	K <sub>M</sub>	Vm	K <sub>M</sub>		
Aucune	133.33	15.15	497.51	33.33		
+ Morine hydrate	125	25.97	$n.d^*$	n.d		
+ Myrécitine	65.78	15.62	125	34.61		
+ Rutine trihydrate	41.66	15.49	495.04	128.20		
+ Ext.Aqueux	134	30.30	512.82	108.69		
+ Ext.Méthanolique	131.57	29.41	498	75		

Doromàtros ainátiquas

\* non déterminé

# II.6. Recherche d'un éventuel effet potentialisateur de l'activité antibiotique de l'imipenème par les extraits de fruits secs de *Terminalia chebula*

Après incubation pendant 24h à 37°C de la souche *A.baumannii* ou de la souche *P.aeruginosa*, avec trois disques un contenant 10µg d'imipinéme; l'autre 10µg d'imipinéme plus 1500 µg d'extraits méthanolique ou aqueux de fruits secs de *T.chebula*, et l'autre 1500 µg d'extraits méthanolique ou aqueux de fruits secs de *T.chebula*, les diamètres des zones d'inhibitions sont mesurés. Ils sont de l'ordre de 8 ; 23 ; 19 ; 19 et 18 mm dans le cas de la souche A.baumannii et de l'ordre de 29 ; 23 ; 25 ; 15 et 23, dans le cas de *P.aeruginosa* (**Fig. 27** ; **Tab. 8**).

## **II.** Discussions

## II.1. Détection phénotypique de Métallo-Beta-Lactamases

Expérimentalement, différentes méthodes sont recommandées pour la détection phénotypique des MBLs. Celles-ci incluent les tests MHT (Test de Hodge modifié) (Al Sehlawi *et al.*, 2013), DDST (Imipenem-EDTA double disc synergy test), CDT (Imipenem-EDTA combined disc test), MBL E-test (metallo-betalactamase E-Test) (Hemalatha *et al.*, 2005; Shanmugame, 2013). Dans ces tests on suit l'effet sur le diamètre des zones d'inhibition de la croissance bactériennes sur milieux solides par les carbapénemes seuls et en présence d'EDTA.



**Figure. 27 :** les zones d'inhibitions de la croissance de *A.baumannii* (A), ou de *P.aeruginosa* (B) cultivées sur Gélose Mueller Hinton, après 24h d'incubation en présence d'extraits aqueux (a) ou méthanolique (b) seuls de fruits secs de *T.chebula* (3000 ou 1500  $\mu$ g), d'imipenème seul (10 $\mu$ g) et d'imipineme (10 $\mu$ g) plus extraits aqueux (c) ou méthanolique (d) de fruits secs de T.chebula (1500  $\mu$ g). IMP= imipenème, EA= extrait aqueux, EM= extrait méthanolique.

		Diamètre de la zone d'inhibition			
Souche testée	Source d'obtention	Ext.Aqueux		Ext.Methanolique	
		Seul	Avec 10µg	Seul	Avec 10µg
		1500µg	IMP	1500µg	IMP
A.baumanni	CHU de Sétif	18	19	19	23
P.aeruginosa	Hôpital d'el Eulma	23	25	15	23

**Tableau. 8 :** Diamètre des zones d'inhibitions (mm) par l'extrait aqueux  $(1500\mu g)$  ou l'extrait méthanolique  $(1500\mu g)$  seuls ou avec l'imipenème  $(10\mu g)$  de la croissance des bactéries testées.

Parija et ses collaborateurs (2009), en cherchant des souches *P.aeruginosa* productrices de MBLs par le test CDT est le test MHT, ont constaté que le premier est plus sensible que le second d'où la nécessité d'utiliser selon le même auteur le test CDT dans ce type d'étude. Dans d'autres tests de détection phénotypique des MBLs, on suit l'effet des concentrations minimales inhibitrices (CMI) sur la croissance bactérienne en milieux liquides manifestes par les carbapénèmes seul et en présence d'EDTA (Hemalatha *et al.*, 2005).

De nombreux travaux sur la détection phénotypique de MBLs ont montré que les isolats cliniques de souches bactériennes appartiennent généralement aux genres *Acinetobacter* et *Pseudomonas* (Crawford *et al.*, 2004; Altoparlak., 2005; Prajapati *et al.*, 2013), plus particulièrement, aux espèces *A.baumannii* et *P.aeruginosa*, dans l'ordre (Hemalatha *et al.*, 2005; Zavascki *et al.*, 2007; Noyal *et al.*, 2009; Santosh et Nilima, 2011; Ahir *et al.*, 2012).

Dans notre cas, le test CDT est utilisé pour la détection phénotypique de MBLs chez dix isolats cliniques de souches bactériennes (*Acinetobacter baumannii* (n= 1), *Pseudomonas aeruginosa* (n= 3), *Klebsiella pneumoniae* (n= 2) et *Escherichia coli* (n= 3), *Serratia* marcescens (n= 1). Ce test a montré que deux souches seulement une *A.baumanni* (A1) et l'autre *P.aeruginosa* (P3) sont résistantes à l'imipenème (diamètres confondus de zones d'inhibition inférieur à 14 mm) et productrices de MBLs (diamètres confondus de zones d'inhibitions en présence d'EDTA superieur à 24, soit une augmentation de plus de 7 mm) (Khosravi *et al.*, 2012; Shanmugam, 2013).

# II.2. préparation des extraits bruts de fruits secs de *T.chebula* et analyse quantitative des polyphénols et des flavonoïdes

Chang et lin (2012) en réalisant des extractions de polyphénols à partir du même matériel végétal, ont constaté que plus la polarité du solvant augmente plus le rendement d'extraction augmente. Ils ont en fait utilisé trois solvants de polarités croissantes, l'eau (16), le méthanol (12.3) et l'éthanol à 95% (8.8) et ils ont obtenu des taux de rendements d'extraction de 21,7% à 39,4% (Chang et Lin, 2012). Nos résultats, bien que différents en ce qui concerne les taux de rendements (confondus supérieurs à 50%), sont les mêmes en ce qui concerne l'effet de la polarité du solvant sur ce paramètre (58.7 % avec de l'eau et 53.5 % avec le méthanol). Ceci peut être dû à plusieurs facteurs : le milieu et la période de récolte, les facteurs climatiques et les conditions d'extraction (Hafsé et *al.*, 2013). Pour ce dernier facteur, plusieurs études ont montré que l'extraction à chaud donne des rendements supérieurs que les procédés d'extraction à froid (Teixeira *et al.*, 2012; Dharmaratn *et al.*, 2013; Mahmoudi *et al.*, 2013). Ce même effet est constaté dans notre cas.
Les fruits secs de *T.chebula* sont en général riches en polyphénols et en flavonoides (Arya *et al.*, 2012). Dans la limite de nos connaissances bibliographiques, le contenu en ces molécules par gramme d'extraits aqueux ou méthanolique de fruits secs de *T.chebula*, peut atteindre  $1041.8\pm 8.6$  et  $924.5\pm 17.2$  mg EAG/g d'extrait, dans l'ordre (Chang et lin, 2012). Ces teneurs sont presque deux fois plus élevés que les nôtres : teneur en polyphénols de nos extraits aqueux et méthanolique de fruits secs de *T.chebula* sont  $513.094\pm 3.061$  et  $496\pm 2.856$  µg EAG/mg d'extrait, respectivement. La différence de nos résultats confirmant relativement cette richesse, peut être due aux mêmes facteurs rapportés dans le cas des taux de rendements d'extractions.

Quant aux flavonoïdes, les teneurs sont de l'ordre de  $39.866\pm0.469$  et  $37.261\pm0.272$  µg EQ/mg d'extrait aqueux et méthanolique de fruits secs de *T.chebula*, respectivement. Nos résultats sont proches de ceux d'Arya et *al* (2012).

## **II.3.** préparation des extraits semi-purifiés de beta-lactamases et analyse quantitative des protéines

Faute d'équipement de lyophilisation, il n'était pas possible pour nous de calculer un rendement ou un taux de protéine dans nos extraits semi-purifiés de beta-lactamases et faire des recoupements avec des données bibliographiques. Nous nous sommes limités en conséquent à des dosages de protéine y existante et à des calculs de concentrations. Celles-ci étaient de l'ordre de 7.9 mg/ml d'extrait à partir de *A.baumannii* et 8.9 mg/ml d'extrait à partir de *P.aeruginosa*. À partir de ces concentrations, nous estimons que nos extraits sont relativement riches en protéines.

#### II.4. Détermination du type de beta-lactamases

Selon la classification d'Ambler, les beta-lactamases sont groupées en quatre classes (Ambler, 1980). Les beta-lactamases de classe A, hydrolysent préférentiellement les pénicillines (d'où le terme pénicillinases). Elles sont sensibles à l'acide clavulanique. Les b-lactamases de classe B, appelée également métallo ou Zn-betalactamases, hydrolysent tous les  $\beta$ -lactamines y compris les carbapénémes sauf l'aztréonam (Zhu *et al.*, 2013). Elles sont résistantes à l'acide clavulanique mais pas aux agents chélateurs d'ions bivalents comme l'EDTA (Ahir *et al.*, 2012 ; Altun *et al.*, 2013). Les beta-lactamases de classe C, hydrolysent préférentiellement les céphalosporines (d'où le terme céphalosporinases) (Drieux, 2012). Elles sont inhibées par la cloxacilline mais pas par l'acide clavulanique. Les beta-lactamases de la

classe D, hydrolysent efficacement l'oxacilline et la cloxacilline que la benzylpénicilline, d'où le terme oxacillinases. Elles sont inhibées par le NaCl, mais pas par l'acide clavulanique.

La comparaison de nos résultats relatifs aux tests d'hydrolyses de céphaloridine par l'extrait semi purifié de beta-lactamases à partir de *A.baumannii* en absence et en présence de l'acide clavulanique, montre que les valeurs de K<sub>M</sub> (15.15 et 15.38  $\mu$ M, respectivement) et de Vm (133.33 ; 134.13, respectivement) sont presque les mêmes. La même comparaison mais en absence et en présence de l'EDTA, montre que les valeurs de K<sub>M</sub> (15.15 et 28.98  $\mu$ M, respectivement) et de Vm (133.33 ; 129.52, respectivement) ne sont pas les mêmes. Ces deux comparaisons confondues montrent que la ou les béta-lactamases de cet extrait semi purifie n'est pas inhibée par l'acide clavulanique mais inhibée par l'EDTA. Ceci confirme les résultats du test CDT c'est à dire qu'il pourrait s'agir d'une ou de betalactamases de type MBLs.

Nous signalons que de nombreux auteurs qualifient *A.baumannii* comme étant un réservoir de carbapénemases (Figueiredo, 2011) et de MBLs (Drissi *et al.*, 2010 ; John et Ramasamy., 2014).

La comparaison de nos résultats relatifs aux même tests mais avec l'extrait semi purifie de beta-lactamases à partir de *P.aeruginosa* en absence et en présence de l'acide clavulanique, montre que les valeurs de  $K_M$  (33.33 et 34.61  $\mu$ M, respectivement) et de Vm (497.51 ; 526.31, respectivement) sont presque les mêmes. La même comparaison mais en absence et en présence de l'EDTA, montre que les valeurs de  $K_M$  (33.33 et 33.51  $\mu$ M, respectivement) et de Vm (497.51 ; 487.80, respectivement) sont les mêmes. Ces deux comparaisons confondues montrent que la ou les béta-lactamases de cet extrait semi purifie n'est inhibée ni par l'acide clavulanique ni par l'EDTA. Ceci confirme les résultats du test CDT c'est à dire il pourrait s'agir d'une ou de beta-lactamases de type SBLs.

### II.5. Mise en évidence des classes de beta-lactamases

Les résultats obtenus suite aux tests d'hydrolyse de la pénicilline G, de la céphaloridine, de l'imipenème ou de l'aztreonam ont montré que l'extrait semi-purifié de *A.baumannii* interagit avec tous les antibiotiques y compris l'imipenème a l'exception de l'aztreonam a des K<sub>M</sub> de 14.92; 15.15 ; 52.57  $\mu$ M ; et les dégradent à des vitesses de 80.64; 133.33 ; 47.62  $\mu$ mol/mg protéine/min, respectivement. L'interaction avec l'imipenème et son hydrolyse reflètent que la ou les betalactamases y existantes sont de type MBLs. Ceci confirme les résultats du test CDT et les résultats du typage. La comparaison du paramètre quantitatif de l'interaction (K<sub>M</sub>) et du paramètre quantitatif de la vitesse d'hydrolyse (Vm) de la céphaloridine dans le cas de la céphaloridine, de la pénicilline G, et de l'imipenème reflètent que cette MBL est une MBL

céphalosporinase autrement dit appartenant à la classe 3c (Rasmussen and Bush., 1997 ; Sharma, 2007 ;Gupta, 2008).

Les résultats obtenus suite aux mêmes tests avec l'extrait semi-purifiés de beta-lactamase à partir de *P.aeruginosa*, ont montré que celui-ci interagit uniquement avec la pénicilline G et la céphaloridine a des K<sub>M</sub> de 20 et 33.33  $\mu$ M et les hydrolyse à des vitesses maximales de 113.63 et 497.51  $\mu$ mol/mg protéine/min, dans l'ordre. D'emblée, l'incapacité d'interagir et d'hydrolyser l'imipenème reflètent que la ou les beta-lactamases y existantes sont de type sérine-betalactamase. Ceci confirme les résultats du test CDT et les résultats du typage. Les paramètres quantitatifs de l'interaction et de l'hydrolyse de la céphaloridine sont supérieurs à ceux de l'interaction et de l'hydrolyse de la pénicilline G. Ceci reflètent que cette SBL est une SBL céphalosporinase (Drieux, 2012), autrement-dit une SBL de la classe C ou D. la comparaison des résultats des mêmes tests en présence et en absence du NaCl (K<sub>M</sub> = 33.35, 33.33 et Vm = 500, 497.51, respectivement) montre que cette ou ces SBLs ne sont pas inhibées par cette molécule ce qui permet de dire qu'il pourrait s'agir d'une SBL de la classe C et non pas de la classe D.

#### II.6. Essais d'inhibition de l'activité enzymatique

L'inhibition des enzymes par les polyphénols en général et les flavonoïdes en particulier soit à l'état pur soit à l'état brut est très recherchée (Girotti-Chanu, 2006). Dans le même sens, nous avons essayé de mettre en évidence ce type d'activité dans le cas des mêmes molécules à l'état pur à savoir trois flavonoïdes de commerce (morine hydrate, myrécitine et rutine trihydrate) et à l'état brut à savoir deux extraits méthanolique et aqueux de fruits secs de *T.chebula* sur deux extraits semi-purifiés de betalactamases l'un à partir d'un isolat clinique de *A.baumannii* et l'autre à partir d'un isolat clinique de *P.aeruginosa*. Cette mise en évidence est réalisée en premier lieu par la détermination du paramètre cinétique IC<sub>50</sub> et en second lieu par la détermination du type d'inhibition.

Dans le cas de l'extrait semi-purifiés de betalactamases à partir de *A.baumannii*, dont la beta-lactamase y contenue est identifiée comme étant une MBL de la classe 3c, les valeurs des IC<sub>50</sub> sont : 23.28, 26.39, 39.71  $\mu$ M, 18.45, 19.68  $\mu$ g/ml de morine hydrate, de myrécitine, de rutine trihydrate, de l'extrait methanolique ou de l'extrait aqueux de fruits secs de *T.chebula*, dans l'ordre. Par comparaison à l'IC<sub>50</sub> de l'EDTA que nous avons déterminé (3.98 mM = 1488.88  $\mu$ g/ml) et de bibliographie (2.3 à 20 mM) (Morán-Barrio *et al.*, 2007), ces molécules semblent être des inhibiteurs puissants de cet extrait enzymatique (en moyenne, 100 fois plus puissants). Ceci peut être expliqué par une capacité de ces molécules à complexer le zinc plus

élevée que celle de l'EDTA. Quant aux types d'inhibitions relatifs, la morine et les deux extraits semblent inhiber d'une façon compétitive l'activité de l'extrait enzymatique en question; la myrécitine, et la rutine trihydrate semblent l'inhibé cependant d'une façon non compétitive. Ceci suppose que les deux extraits contiennent beaucoup plus de flavonoïdes de structures proches à celle de la morine hydrate que de flavonoïdes de structure proche à celle de la myrécitine et de la rutine trihydrate.

Dans le cas de l'extrait semi-purifiés de betalactamases à partir de *P.aeruginosa*, dont la beta-lactamase y contenue est identifiée comme étant une SBL de la classe C, les valeurs de ce paramètre sont : 30, 27.10, 21.03  $\mu$ M, 7.04, 12.07  $\mu$ g/ml de morine hydrate, de myrécitine, de rutine trihydrate, de l'extrait méthanolique ou de l'extrait aqueux de *T.chebula*, dans l'ordre. Ces molécules agissant a des concentrations de l'ordre de microgrammes, semblent être des inhibiteurs puissants de cet extrait enzymatique. Quant aux types d'inhibitions relatifs, la morine et la rutine et les deux extraits semblent inhiber d'une façon compétitive l'activité de l'extrait enzymatique en question; la myrécitine semble l'inhibé cependant d'une façon non compétitive.

## II.7. Recherche d'un éventuel effet potentialisateur de l'activité antibiotique de l'imipenème par les extraits de fruits secs de *Terminalia chebula*

Les effets potentialisateurs des inhibiteurs de beta-lactamases de l'activité antibiotique sont souvent étudiés pour vérifier l'efficacité de ces inhibiteurs à l'échelle cellulaire bactérienne (Deepack et al., 2010). Les paramètres quantifiés dans ce type de test sont les diamètres des zones d'inhibitions (si le test est réalisé sur milieu solide) ou les CMI (si le test est réalisé sur milieu liquide) (Peyrou, 2001; Al Sahli et Abdulkhair, 2011). Dans le même sens, nous avons essayé dans notre cas d'étudier cet effet potentialisateur des extraits aqueux et méthanolique de fruits secs de T.chebula de l'activité antibactérienne de l'imipenème sur la croissance de A.baumannii sur milieu solide. Les zones d'inhibitions obtenues sont 8, 18, 19, 19 et 23 mm, respectivement, avec l'imipenème seul, l'extrait aqueux seul, l'extrait méthanolique seul, l'imipinéme plus extraits aqueux et l'imipinéme plus extraits méthanolique. Lorsqu'on compare le diamètre d'inhibition dû à l'imipenème seul aux diamètres des zones d'inhibitions dû à l'extrait aqueux seul et à l'extrait aqueux plus imipinéme (diamètres de valeurs très proches), on constate qu'il n y a aucun effet potentialisateur et que l'augmentation du diamètre de la zone d'inhibition dû à la combinaison IMP+EA revient à une activité antibactérienne plutôt qu'a une activité anti-MBLs. Lorsqu'on fait cette même comparaison dans le cas de l'extrait méthanolique (diamètres de valeurs relativement differentes), on constate qu'il y a un faible effet potentialisateur et que l'augmentation du diamètre de la zone d'inhibition dû à la

combinaison IMP+EM revient en partie à une activité antibactérienne et en partie à une activité anti-MBL.

Toujours dans le même sens, Nous avons essayé d'étudier cet effet potentialisateur des mêmes extraits de l'activité antibactérienne du même antibiotique mais sur la croissance de *P.aeruginosa* toujours sur milieu solide. Les zones d'inhibitions obtenues sont 29, 23, 15, 25, 23 mm, respectives, avec l'imipenème seul, l'extrait aqueux seul, l'extrait méthanolique seul, l'imipenème plus extraits aqueux et imipenème plus extraits méthanolique. Lorsqu'on fait le même recoupement on constate globalement un effet antagoniste des extraits plutôt qu'un effet potentialisateur sur l'activité antibactérienne de l'imipenème sur cette souche. Cet effet antagoniste ne peut être expliqué que par le phénomène d'induction de biosynthèse de carbapénémase, phénomène rapporté avec plusieurs antibiotiques y compris l'imipenème.

# Perspectives

## PERSPECTIVES

Les trois flavonoïdes de commerce ainsi que l'extrait de fruits secs de *Terminalia chebula* inhibent les MBL à des concentrations de l'ordre de microgrammes. Ces concentrations peuvent être plus faibles (à l'ordre de nano-grammes) si les extraits auraient été réalisés sur des MBL purifiés

Nous envisageons en conséquent :

- la reproduction des mêmes tests avec des MBL purifiés.
- élargissement de la gamme de molécules testées à des molécules de synthèse chimique.
- recherche d'effet potentialisateur de l'effet des antibiotiques sur la croissance de bactérie résistante (effet sur zone d'inhibition et sur CMI).

Références

## bíbliographiques

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).

Aggoune-khinache N, Bensersa D, Henniche FZ, Daoudi M, Abdouni MA, Chabani A, Tiouit D and Naim M. Metallo-betalactamases producing *Pseudomonas aeruginosa* in Algeria. *Médecine et maladies infectieuses*. 39: 413–414; (2009).

Ahir HR, Patel PH, Berry RA, Parmar R, Soni ST, Shah PK, Vegad MM and Patil S. Prevalence Of Metallo-B-Lactamases Producing *Pseudomonas* And *Acinetobacter* Species In Tertiary Care Teaching Hospital, Gujarat. *International Journal of Microbiology Research*. 4: 322-325, (2012).

Al Sahli AA and Abdulkhair WM. Inhibition of beta-lactamase enzyme of *Pseudomonas aeruginosa* by clavulanic acid of *Rumex vesicarius* L. *African Journal of Agricultural Researc.* 6 : pp. 2908-2915, (2011).

Al Sehlawi ZS, Almohana AM and AlThahab AA. Occurrence and detection of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumonia* clinical isolates in Najaf Hospital. *Magazine of Al-Kufa University for biology*.; 5 (2); (2013).

Altoparlak U, Aktas F, Celebi D, Ozkurt Z and Akcay MN. Prevalence of metallo-b -lactamase among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from burn wounds and in vitro activities of antibiotic combinations against these isolates. *Burns* 31: 707–710; (2005).

Altun S, Tufan ZK, *Yağcı S*, Önde U, Bulut C, Kinikil A and Demiroz AP. Extended spectrum betalactamases AmpC and metallo-betalactamases in emerging Multi-drug Resistant Gram-Negative Bacteria in Intensive Care Units. *Sientific Reports*. 2 : 1-4. (2013).

Ambler, R. P. The structure of b-lactamases. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 289:321-331.(1980).

**Anthoni J.** Synthèse enzymatique, modélisation moléculaire et caractérisation d'oligomères de flavonoides. These de doctorat. *L'institut national polytechnique de lorraine* ; p :28-30 (2007).

Arya A, Nyamathulla S, Noordin MI and Mohd MA. Antioxidant and Hypoglycemic Activities of Leaf Extracts of Three Popular Terminalia Species. *E-Journal of Chemistry*. 9: 883-892; (2012).

**Bahorun T,** Gressier B, Trotin F, Brunete C, Dine T, Vasseur J, Gazin J C, Pinkas M, Luycky M and Gazin M. Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-Forschung.* 46: 1086-1089; (1996).

**Bebrone C.** Metallo-β-lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. *Biochem. Pharmacol.* 74: p.1686–1701; (2007).

**Borra NPS.** Structural and biochemical investigation of Metallo-betalactamases; insights into the intobiotic binding sites. A dissertation for the degree of philosophiae doctor; (2012).

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).

Boussoualim N, Meziane-Cherif D and Baghiani A. Kinetic study of different flavonoids as inhibitors of betalactamase enzyme. *African Journal of Biochemistry Research*. 5: 321-327; (2011).

**Bradford M M.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254. (1976).

**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).

Brown NG, Horton LB, Huang W, Vongpunsawad S and Palzkill T. Analysis of the functional contributions of Asn 233 in metallo-betalactamase IMP-1. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55: 5696–5702. (2011).

Bush K. Metallo-b-Lactamases: A Class Apart .*Clinical Infectious Diseases*;27(Suppl 1):S48–53; (1998).

**Bush K, Jacoby GA and Medeiros AA**. A functional classification scheme for  $\beta$  -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother*; 39: 1211-33; (1995).

**Carfi A, Pares S, Duee E, Galleni M, Duez C, Frere JM and Dideberg O.** The3-D structure of a zinc metallobeta-lactamase from Bacillus cereus reveals a new type of protein fold. *The EMBO Journal vol*.14: 4914-4921; (1995).

**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-b-lactamase active sites. *FEBS Letters 586.* pp: 3710–3715; (2012).

**Chang CL, Lin CS.** Phytochemical Composition, Antioxidant Activity, and Neuro protective Effect of Terminalia chebula Retzius Extracts. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine... 2012: 125247; (2012).

Chantalat L, Duée E, Galleni M, Frère JM and Dideberg OT. Structural effects of the active site mutation cysteine to serine in Bacillus cereus zinc-b-lactamase, *Protein Science*, 9:1402–1406; (2000).

**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).

**Chen CC and Herzberg O.** Structures of the acyl-enzyme complexes of the Staphylococcus aureus beta-lactamase mutant Glu166Asp:Asn170Gln with benzylpenicillin and cephaloridine. *Biochem. J.*, 40: 2351-2358. (2000).

Cornaglia G, Giamarellou H and Rossolini GM. Metallo-betalactamases: a last frontier for betalactams?. *Lancet Infect Dis* 11: 381-93; (2011).

Cornelis P. Pseudomonas Genomics and molecular biology .Antibiotic resistance in pseudomonas. *Caister academic press* .p188-189; (2008).

**Crawford PA, Sharma N, Chandrasekar S, Sigdel T,Walsh TR, Spencer J and Crowdera MW.** Overexpression, puriWcation, and characterization of metallo-β-lactamase ImiS from Aeromonas veronii Bv. Sobria. *Protein Expression and PuriWcation* .36 :272–279; (2004).

**Deepak S, kamat SD and Kama DV.** Effect of Aqueous Extract of Terminalia Chebula on Metallo-betalactamase. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2: 172-175. (2010).

**De Seny D, Heinz U, Wommer S, Keifer M, Meyer-Klauche W, Galleni M, Frére J M, Bauer R and Adolph H W.** Metal ion binding and coordination geometry for wild type and mutants of metallo-betalactamase from Bacillus cereus 569/H/9 (Bc II) -a combined thermodynamic, Kenitic, and Spectroscopic approach. *The Journal Biological Chemistry*. 276: 45065-45078; (2002).

**Dharmaratne MPJ, Manoraj A, ThevanesamV, Bandara BMR, Ekanayake E and Kumar NS.** Antibacterial Activity of Aqueous Extracts of Terminalia chebula Fruit against Some Multidrug-Resistant Human Pathogens. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences.*, 4: 1333-1337; (2013).

Djeridane M, Yousfi B, Nadjemi D, Boutassouna P and Stocker N. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem*, 97, 654-660; (2006).

**Drawz SM, and Bonomo RA.** Three Decades of beta-Lactamase Inhibitors. *Clinical Microbiology Reviews*. 23:160-201; (2010).

**Drieux L.** Succés plasmidique: transmission inter-espèce d'un plasmide portant un gène de métallo-betalactamase. *Thèse de Doctorat, discipline : Microbiologie.* (2012).

Drissi, M.; Poirel, L.; Mugnier, P. D.; Z. Baba Ahmed and Nordmann, P. Carbapenemase-producing Acinetobacter baumannii, Algeria. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 29: 1457-1458, (2010).

**Dugal S and Fernandes A.** Carbapenem hydrolyzing metallo- beta-actamases: a review. *Int J Curr Pharm Res*, 3: 9 - 16 (2011).

**Faridoon and Islam N UL.** An Update on the Status of Potent Inhibitors of Metallo-β-Lactamases. *Sci Pharm J*. 81: 309-327. (2013).

**Figueiredo S.** Acinetobacter spp et réservoir de gènes de carbapénèmases. Thèse de Doctorat, discipline : Bactériologie. (2011).

Galleni M, Lamotte-brasseur J,Rossolini GM, Spencer j, Dideberg O, Freére JM, and The metallo-blactamase working group. Standard numbering scheme for class b b-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45: 660–663; (2001).

Garau G, Bebrone C, Anne C, Galleni M, Freére JM, and Dideberg O.A Metallo-b-lactamase Enzyme in Action:Crystal Structures of the Monozinc Carbapenemase CphA and its Complex with Biapenem *.J. Mol. Biol.* 345, 785–795; (2005).

**Gautier V.** Caractérisation et expression des gènes codant pour les  $\beta$ -lactamases chromosomiques au sein des entérobactéries de l'environnement. Thèse de doctorat. *École pratique des hautes études* ; (2007).

**Girotti - Chanu C.** Etude de la lipolyse et de la synthése de composés d'un derme sous l'effet de la cirsimarine, flavone extraite de Microtea debilis , Ecole doctorale interdisciplinaire science - Santé, Formation doctorale : Biochimie. *Thèse de Doctorat* (2006).

**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).

**Gopal JV.** Morin Hydrate: Botanical origin, pharmacological activity and its applications: A mini-review. *Pharmacognosy Journal*; 5 (3): 123-126; (2013).

**Gupta V**. Metallo beta lactamases in Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter species Expert Opin. *Investig. Drugs* **17**:131-143, (2008).

Hafsé M., Benbrahim K. F., Abderrahim Saidi A. and Farah A. Volatile Components and Antibacterial Profile of Essential Oils Extracted from Leaves and Twigs of Pistacia lentiscus L. *British Microbiology Research* Journal 3(4). (2013).

Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. Pharmacol Therap; 96:67-202; (2002).

Hemalatha V, Sekar U and Kamat V. Detection of metallo betalactamase producing Pseudomonas aeruginosa in hospitalized patients. *Indian J Med Res.* 122: 148-152. (2005).

**Hu Z, Periyannan GR and Crowder MW.** Folding strategy to prepare Co(II)-substituted metallo-β-lactamase L1. *Anal Biochem*; 378: 177-183; (2008).

John S, Ramasamy B. Bioprospection of marine *Streptomycetes* sp for its antagonistic activity on MDR *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolates. *Asian Pac J Trop Dis.* 4: S290-S296; (2014).

Jang JW, Lee JK, Hur H, Kim TW, Joo SP and Piao MS. Rutin improves functional outcome via reducing the elevated matrix metalloproteinase-9 level in a photothrombotic focal ischemic model of rats. *Journal of the Neurological Sciences*, 339(1-2) : 75-80 ; (2014).

**Karsisiotis AI, Damblon Cf, Roberts Gck.** structures of the Bacillus cereus metallo- $\beta$  -lactamase BcII and its complex with the broad spectrum inhibitor R-thiomandelic acid. *Biochem. J.* 456, pp: 397–407; (2013).

**Karsisiotis AI, Damblon C and Roberts GCK** "A variety of roles for versatille zinc in metallo-β-lactamases" . *Metallomics*, PMID: 24696003, DOI: 10.1039/C4MT00066H. (2014).

**Khosravi Y, Loke MF, Chua EG, Tay ST, Vadivelu J.** Phenotypic Detection of Metallo-β-Lactamase in Imipenem-Resistant Pseudomonas aeruginosa. The Scientific *World Journal*. Article I D 654939,7 pages (2012).

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-b-Lactamase. PLoS ONE 6(9): e24621. doi:10.1371/journal.pone.0024621: (2011).

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- $\beta$ -lactamase IMP-1 produced by Escherichia coli. Antimicrob. Agents Chemother. 43:902–906; (1999).

Le Nest G, Caille O, Woudstra M, Roche S and Guerlesquin F. lexa D. Zn-polyphenols chelation: complexes with quercetin, (+)-catechin, and derivatives: I optical and NMR studies. *Inorganica Chim ica Acta*;357:775-784. (2004).

Li H B, Cheng K W, Wong C C, Fan K W, Chen F and Jiang Y. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chemistry*, 102: 771-776; (2007).

**Ljubuncic P, Song H, Cogan U, Azaizeh H and Bomzon A (2005).** The effects of aqueous extracts prepared from the leaves of Pistacia lentiscus in experimental liver disease. *Journal of Ethnopharmacology*, 100: 198-204; (2005).

Macart M and Gerbaut L. An improvement of the coomassie blue dye binding method allowing an equal sensitivity to various proteins application to cerebrospinal fluid. *Clin Chem Acta.*, 122: 93-101 ; (1982).

Mahmoudi S., khali M. and Mahmoudi N. Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.). *Nature & Technologie* 9: 35-40. (2013).

Majiduddin FK, Materon IC and Palzkill TG. Molecular analysis of betalactamas structure and function. *Int. J. Med. Microbiol.* 292: 127 - 137 (2002).

**Minasov G, WangH and Shoichet B K.** An ultrahigh resolution structure of TEM-1  $\beta$ -lactamase suggests a role for Glu166 as the general base in acylation. *J. Am. Chem. Soc.*, 124: 5333-5340; (2002).

Mollard C, Moali C, Papamicael C, Damblon C, Vessilier S, Amicosante G, Schofield CJ and Galleni M, Frére JM and Roberts GC. Thiomandelic acid, a broad spectrum inhibitor of zinc  $\beta$ -lactamases: kinetic and spectroscopic studies. J. Biol. Chem., 276: 45015-45023; (2001).

**Morán-Barrio J, González JM, Lisa MN et al.** The Metallo- B -Lactamase Gob Is A Mono-Zn (II) Enzyme With A Novel Active Site. *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology*. pp:1-14.(2007).

Motamed S M and Naghibi F. Antioxidant activity of some edible plants of the Turkmen Sahra region in northern Iran. Food Chemistry, 119: 1637-1642; (2010).

Noyal M.J.C , Menezes G.A, Harish B.N, Sujatha S and Parija S.C. Simple screening tests for detection of carbapenems in clinical isolates of gram-negative bacteria. *Indian J Med Res* ;129:707-712. (2009).

**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).

**Page MI, Badarau A.** The mechanisms of catalysis by metallo-betalactamases. *Bioinorganic Chemistry and Applications*. pp: 1-14. (2008). ISSN 1565-3633.

Palmer M, Chan A, Dieckmann T and Honek J. Notes to Biochemical pharmacology, Antibiotics and the bacterial cell wall. John Wiley & S, Inc, Hoboken New Jersey. (2014).

Payne DJ. Metallo-β-lactamases: a new therapeutic challenge. J.Med. Microbiol Vol.39. p. 93-99. (1993).

Payne DJ, Bateson JH, Gasson BC, Proctor D, Khushi T, Farmer TH, Tolson DA, Bell D, Skett PW and Marshall AC. Inhibition of metallo- $\beta$ -lactamases by a series of mercaptoacetic acid thiol ester derivatives. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Vol.41, No.1. p. 135-140; (1997).

**Peyrou M**. Antimicrobial Susceptibility of Equine Bacterial Specimens: A Review And Evolution In A Canadian Veterinary Teaching Hospital. (2001).

**Philippon A, Dusart J, Joris B, Frère J M.** The diversity, structure and regulation of  $\beta$ -lactamases. *CMLS. Cell. MoL. Life Sci.*, 54: 341-346. (1998).

**Pollini S, Maradei S, Pecile P, Olivo G, Luzzaro F, Docquier JD and Rossolini GM.** FIM-1, a New Acquired Metallo-β-Lactamase from a Pseudomonas aeruginosa Clinical Isolate from Italy. *Antimicrob. Agents Chemother*. 57:410-416; (2013).

*Poirel* L and *Nordmann* P. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect;* 8(6): 321-31; (2002).

**Prajapati S B, Oza S G, Mehta SJ and Vegad M M.** Prevalence of Metallo-betalactamase producing Pseudomonas Spp. (In Tertiary Care Hospital). NJIRM, Vol 4 :( 2); 68-70; (2013).

**Prakash DVS, Satya NS, Avanigadda S and Vangalapati M.** Pharmacological Review on Terminalia Chebula. International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences. , 3: 679-683; (2012).

**Rangsriwong P, Rangkadilok N, Satayavivad J, Goto M and Shotipruk A.** Subcritical water extraction of polyphenolic compounds from *Terminalia chebula* Retz. Fruits. *Separation and Purification Technology*. 66: 51–56; (2009).

**Rasmussen BA and Bush K.** Carbapenem-hydrolyzing  $\beta$  -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*; 41: 223 - 32; (1997).

Rath S, Dubey D, Sahu MC, Debata NK and Padhy RN. Surveillance of ESBL producing multidrug resistant *Escherichia coli* in a teaching hospital in India. Asian Pac J Trop Dis. 4: 2, pp 140-145. (2014)

**Rath S and padhy RN.** Monitoring in vitro efficacy of holarrhena antidysenterica against multidrug resistant enteropathogenic bacteria. Asian Pac J Trop Dis. 4: 1, pp S54-S63; (2014).

**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).

**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).

**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).

Sabath LD and Abraham EP. Zinc as a cofactor for cephalosporinase from *Bacillus cereus* 569. *Biochem J*, 98:11c13c; (1966).

Saino Y, Kobayashi F, Inoue M and Mitsuhashi S. Purification and Properties of Inducible Penicillin, Beta-Lactamase Isolated from Pseudomonas maltophilia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 4:564-570; (1982).

**Sancheti S, Sancheti S, Um BH and Seo SY.** 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- β -D -glucose: A cholinesterase inhibitor from Terminalia chebula. *South African Journal of Botany* 76 : 285–288; (2010).

**Santosh AK and Nilima T.** Prevalence and Antimicrobial Susceptibility Profile of Metallo-B-Lactamases (M-B-L) Producing Pseudomonas Areuginosa from Rural Hospital: Comparison of Two Disk Diffusion Methods. *International Journal of Basic and Applied Medical Sciences*; (2011).

Savic S, Vojinovic K, Milenkovic S, Smelcerovic A, Lamshoeft M and Petronijevic Z. Enzymatic oxidation of rutin by horseradish peroxidase: Kinetic mechanism and identification of a dimeric product by LC–Orbitrap mass spectrometry. *Food Chemistry*, 141(4): 4194-4199; (2013).

**Shanmugam M.** Detection of metallo-betalactamase producing Pseudomonas aeruginosa in hospitalized patients at VIMS, Bellary. Departement of microbiology Vijayanangar Institute of Medical Sciences, Bellary. *A dissertation for the degree of Doctor of medicine in microbiology*. (2013).

**Sharma NP**, Structure/function studies on metallo-β-lactamase ImiS FROM Aeromonas Bv. Sobria. These de doctorat en physiologie, Miami university,oxford, Ohio; (2007).

**Simm AM, Loveridge EJ, Crosby J, Avison MB, Walsh TR and Bennet PM**. Bulgecin A: a novel inhibitor of binuclear metallo-β-lactamases. *Biochem. J.* 387: 585-590; (2005).

Singha Roy A, Kumar Dinda A, Chaudhury S and Dasgupta S. Binding of antioxidant flavonol morin to the native state of bovine serum albumin: Effects of urea and metal ions on the binding. *Journal of Luminescence*; DOI: 10.1016/j.jlumin.2013.08.054 (2014).

Sowa M, Sèlepokura K and Matczak-Jon E. Pharmaceutical cocrystal of myricetin in combination with uncommon piracetam conformer: X-ray single crystal analysis and mechanochemical synthesis. *Journal of Molecular Structure*, 1058: 114-121; (2014).

**Teixeira B, Marques A, Ramos C, Batista I, Serrano C, Matos O, Neng NR, Nogueira JMF, Saraiva JA and Nunes ML**. European pennyroyal (Mentha pulegium) from Portugal: Chemical composition of essential oil and antioxidant and antimicrobial properties of extracts and essential oil. Industrial Crops and Products 36: 81–87. (2012).

**Toney JH, Cleary KA, Hammond GG, Yuan X, May WJ, Hutchins SM, Ashton WT and Vanderwall DE.** Structure-activity relationships of biphenyl tetrazoles as metallo-betalactamase inhibitors. Bioorganic & *Medicinal Chemistry Letters*. Vol: 9, pp 2741-2746. (1999).

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- $\beta$ -lactamase. *Chem. Biol.* 5:185–196. (1998).

**Tsang WY, Dhanda A, Schofield CJ, Frére JM, Galleni M and Page MI.** The inhibition of metallobetalactamase by thioxo-cephalosporin derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*; 14:1737-1739; (2004).

**Ullah JH, Walsh TR, Taylor IA, Emery DC, Verma CS, Gambin SJ and Spencer J.** The crystal structure of the L1 metallo-beta-lactamase from *Stenotrophomonas maltophilia* at 1.7 A resolution. *J Mol Biol 284*, pp 125-136 (1998).

Vella P, Hussein WM, Leung EWW, Clayton D, Ollis DL, Mitic N, Schenk G and McGeary Rp. The identification of new metallo-betalactamase inhibitor leads from fragment based screening. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 21: 3282-3285. (2011).

Vuorela S. Analysis, isolation, and bioactivities of rapeseed phenolics. Helsinki. (2005).

**Wachino JI, Yamaguchi Y, Mori S, Kurosaki H, Arakawa Y and Shibayama K..** Structural Insights into the Subclass B3 Metallo-β-Lactamase SMB-1 and the Mode of Inhibition by the Common Metallo-β-Lactamase Inhibitor Mercaptoacetate. *Antimicrob Agents Chemother*. 57: 101-109; (2013).

Walle T, Vincent TS and Walle U K. Evidence of covalent binding of the dietary flavonoid quercetin to DNA and protein in human intestinal and hepatic cells. *Biochem. Pharmacol.* 65, 1603–1610; (2003).

Walsh TR, Toleman MA, Poirel L and Nordmann P. Metallo-b-lactamase: the Quiet before the Storm? *Clin Microbiol Rev*, 18: 306-25; (2005).

Watanabe M, Iyobe S, Inoue M and Mitsuhashi S. Transferable Imipenem Resistance in *Pseudomonas* aeruginosa. Antimicrobial agents and chemotherapy, 35:147-151.(1991).

**Yong D, Lee K, Yum JH, Shin HB, Rossolini GM and Chong Y.** Imipenem-EDTA Disk Method for Differentiation of Metallo-beta-Lactamase-Producing Clinical Isolates of *Pseudomonas spp.* and *Acinetobacter spp. J. clin .microbiol.* 40: 3798–3801; (2002).

Zavascki AP, Goldani LZ, Gonçalves ALS, Martins AF and Barth AL. High prevalence of metallo-blactamase-mediated resistance challenging antimicrobial therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian teaching hospital. *Epidemiol. Infect.* 135:343-345; (2007).

**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).

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-b-lactmase-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 431: 2–7; (2013).

**Zubair M, Malik A and Ahmad J.** Prevalence of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from diabetic foot ulcer patients. Diabetes & Metabolic Syndrome: *Clinical Research & Reviews* 5:90–92; (2011).