

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE FERHAT ABBAS - SETIF-1
FACULTE DE TECHNOLOGIE
DEPARTEMENT DE GENIE DES PROCEDES

THESE

Présentée par

Zakia MESSASMA Ep BESSOU

En vue de l'obtention du diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCES

Option : Génie des Procédés Pharmaceutiques

THEME

**Etude des activités inhibitrice d'une métallo-bêta-lactamase et de
la croissance de *A. Baumannii* des ligands bases de Schiff
symétriques et de leurs complexes de zinc.**

Soutenue le : **03/02/2019**

Devant le Jury composé de :

MERBAH-ELKOLLI Meriem	Présidente	Professeur	U.F.ABBAS. SETIF-1
MAHDADI Rachid	Rapporteur	M.C.A	U.F.ABBAS. SETIF-1
OURARI Ali	Co-Rapporteur	Professeur	U.F.ABBAS. SETIF-1
LALAOUI Korichi	Examineurs	Professeur	U.Constantine
REFFAS Abdelbaki	Examineurs	M.C.A	U.M.B.M'sila
HELLAL Abdelkader	Examineurs	M.C.A	U.D.B Khmis Miliana
KHANCHOUCHE A/Halim	Membre invité	M.C.A	U.F.ABBAS. SETIF-1

Remerciements

« Tout d'abord merci à mon Dieu »

Je tiens à remercier en tout premier lieu, mes encadreurs Monsieur le Professeur Ali OURARI et Monsieur le Docteur Rachid MAHDADI de l'université de SETIF-1 pour leur encadrement, leur soutien constant ainsi que leur rigueur scientifique avec la quelle ce travail a été mené.

Ainsi, je tiens à remercier chaleureusement les Professeurs Meriem MERBAH EL-KOLLI, Korichi LALAOUI ainsi que les docteurs Abdelbaki REFFAS, Abdelkader HELLAAL et A/Halim KHANCHOUCHE pour avoir bien voulu participer à ce jury.

Grand merci également à toutes les personnes avec qui j'ai partagé les paillasses, matériel, conseils techniques et toutes autres discussions scientifiques : Djohra AGGOUNE (Maitre de conférences), Embarek BENTOUHAMI (Professeur), Nadjib CHAFAA (Maitre de conférences) et A.Hakim AOUF (Maitre de conférences).

Je ne saurais oublier d'adresser mes remerciements à ma collègue Selma HOUCHI que j'ai côtoyée au cours de la réalisation de ce travail.

Je veux dire merci à toute ma famille ; mais surtout à mon père, ma mère , mes filles, mes frères et mes sœurs, pour leur aide, leur patience et leur encouragement.

Enfin, j'aimerais sincèrement remercier mon mari de m'avoir soutenu et encouragée pour faire aboutir ce travail.

Dédicaces



Je tiens à dédier ce travail avec grand respect, sincérité et fierté :

*A mes chers parents,
Source de tendresse, de
noblesse et d'affection.*

*A mon mari
Pour son affection, son
soutien et tous les
sacrifices consentis tout le
long de ce travail.*

*A mes filles Ritadj et Dina Riham
que ce travail soit pour vous un
exemple à suivre.*

A mes chères sœurs et chers frères

A tous les membres de ma famille

A tous mes amis

.... Zakia

Table des matières

Table des matières	I
Liste des figures	IV
Liste des tableaux	VII
Liste des schémas	VIII
Introduction générale	01

Chapitre I : Rappels bibliographiques

I.1. Chimie de coordination	04
I.2. Bases de Schiff	04
I.2.1. Définition	04
I.2.2. Synthèse	07
I.2.3. Classification	07
I.3. Complexes métal-bases de Schiff	08
I.3.1. Généralités	08
I.3.2. Complexes de zinc-base de Schiff	09
I.3.2.1. Complexes de zinc non symétriques	09
I.3.2.2. Complexes de zinc symétriques	12
I.4. Applications et activités biologiques des ligands bases de Schiff et leurs complexes de zinc	12
I.4.1. Activité antienzymatique	13
I.4.2. Activité antibactérienne	14
I.5. Résistance bactérienne et Bêta-lactamines	15
I.5.1. Bêta-lactamines	15
I.5.2. Mécanismes généraux de résistance bactérienne aux bêta- lactamines	18
I.5.3. Mécanisme de résistance par production de bêta-lactamases (BLs)	21
I.5.3.1. Historique	21
I.5.3.2. Généralités sur les bêta-lactamases	22
I.5.3.3. Classification des bêta-lactamases	23
I.5.4. Mécanisme de résistance bactérienne par production de métallo-bêta-lactamases (MBLs)	24
I.5.4.1. Historique	24
I.5.4.2. Définition	25
I.5.4.3. Classification	26
I.5.4.4. Structures	27
I.5.4.5. Mécanisme d'action	32
I.5.4.6. Inhibiteurs	34
I.5.5. Epidémiologie	36
I.5.5.1. Au niveau mondial	36
I.5.5.2. En Algérie	36
I.5.6. Infections nosocomiales	37
I.5.6.1. Généralités	37
I.5.6.2. Infections nosocomiales bactériennes	38
I.5.6.3. Epidémiologie	40

I.5.6.4. Prévention	41
Références bibliographiques	42

Chapitre II : Synthèse et Caractérisation des ligands base de Schiff et leurs complexes

II.1. Mesures physico-chimiques	50
II.1.1. Chromatographie sur couche mince	50
II.1.2. Température de fusion	50
II.1.3. Conductimétrie	50
II.1.4. Analyse élémentaire	50
II.1.5. Infrarouge (IR).....	51
II.1.6. Ultraviolet -Visible (UV-Vis)	51
II.1.7. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)	51
II.2. Synthèse des ligands	51
II.2.1. Réactifs et solvants utilisés	51
II.2.2. Synthèse des ligands au pont pyridine	51
II.2.3. Synthèse du ligand au pont phenyl	52
II.2.4. Synthèse du ligand au pont propyl	53
II.2.5. Synthèse du ligand au pont éthyle	54
II.3. Synthèse des complexes de zinc	55
II.4. Caractérisations et identification des structures	57
II.4.1. Conductivité molaire	57
II.4.2. Analyse élémentaire	58
II.4.3. Spectroscopie infrarouge	58
II.4.4. Analyse par UV/Vis	60
II.4.5. Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)	61
II.4.5.1. RMN ¹ H	61
II.4.5.2. RMN ¹³ C	63
II.5. Conclusion	63
Références bibliographiques	64
Annexe	66

Chapitre III : Etude théorique des ligands bases de Schiff synthétisés

III.1. Modélisation moléculaire	66
III.2. Descripteurs moléculaires et types	68
III.2.1. Descripteurs géométriques	68
III.2.2. Descripteurs physico-chimiques	70
III.2.3. Descripteurs quantiques /électroniques	73
III.3. Les calculs de la chimie quantique	73
III.3.1. Spectroscopie vibrationnelle	76
III.3.2. Spectres d'absorption électroniques	80
III.3.3. Structures géométriques optimisées	83
III.3.4. Analyse des orbitales moléculaires frontalières (FMO)	87

III.3.5. Charges atomiques Mulliken	90
III.3.6. Analyse du potentiel électrostatique moléculaire	97
III.3.7. Propriétés thermodynamiques	94
Références bibliographiques	96

Chapitre IV : Activités anti-métallo-bêta-lactamases et antibactérienne

IV.1. Activité anti-métallo-bêta-lactamases des ligands bases de Schiff	99
IV.1.1. Matériels biologiques et expérimentations	99
IV.1.1.1. Souches bactériennes	99
IV.1.1.2. Détection phénotypique de métallo-bêta-lactamases par le test CDT	99
IV.1.1.3. Préparation et caractérisation d'un extrait semi-purifié d'une métallo-bêta-lactamase	99
a. Préparation	100
b. Analyse quantitative des protéines	100
c. Détermination de la classe (confirmation des résultats du test CDT) et sous classe de bêta-lactamase	101
d. Détermination de la sous classe de bêta-lactamase	102
IV.1.1.4. Essais de mise en évidence d'une activité anti-métallo-bêta-lactamase par les ligands bases de Schiff H_2L^2 , H_2L^3 , H_2L^4 et H_2L^5	102
IV.1.1.4.1. Mise en évidence d'une éventuelle activité anti-métallo-bêta-lactamase	103
IV.1.1.4.2. Mise en évidence du type de l'activité anti-métallo-bêta-Lactamase	103
IV.1.2. Résultats et discussion	103
IV.1.2.1. Détection phénotypique de métallo-bêta-lactamases par le test CDT	103
IV.1.2.2. Caractérisation de l'extrait semi-purifié d'une metallo- bêta-Lactamase	105
a. Analyse quantitative des proteines.....	105
b. Détermination de la classe (confirmation des résultats du test CDT)	107
c. Détermination de la sous classe de bêta-lactamase	108
IV.1.2.3. Mise en évidence d'une activité anti-métallo-bêta-lactamase	110
IV.1.2.4. Mise en évidence du type de l'activité anti-métallo-bêta-lactamase ..	114
IV.2. Activité antibactérienne des ligands bases de Schiff H_2L et leurs complexes de zinc $Zn(II)L$	115
IV.2.1. Matériels et expérimentations	115
IV.2.1.1. Souches bactériennes testées	115
IV.2.1.2. Test de selectivité	116
IV.2.1.3. Test de diffusion de disque	117
IV.2.2. Résultat et discussion	117
References bibliographiques	121
Conclusion générale et perspectives	124

Liste des figures

Figure I.1 :	Structure d'une base de Schiff	4
Figure I.2 :	Exemples de bases de Schiff décrites dans la littérature.	6
Figure I.3 :	Liaison hydrogène intramoléculaire stabilisant les bases de Schiff dérivées de l'aldéhyde salicylique.	7
Figure I.4 :	Réaction de formation d'une base de Schiff.	7
Figure I.5 :	Structure de l'unité asymétrique comportant les deux complexes de Zn(II)-BS.	10
Figure I.6 :	Présentation ORTEP ZnL ₂ , les atomes H sont montrés comme de petites sphères de rayons arbitraires. Les liaisons hydrogène sont représentées par des lignes en pointillés.	10
Figure I.7 :	Structure proposée du complexe ZnL ₂ .	11
Figure I.8 :	La structure cristalline du complexe [ZnL (NO ₃) ₂] NO ₃ avec schéma de numérotation atomique.	11
Figure I.9 :	La structure du complexe Zn(II) et son précurseur.	12
Figure I.10 :	Structure de base des bêta-lactamines.	16
Figure I.11 :	Les classes d'antibiotiques bêta--lactamines. Structure de base de la pénicilline (A). Structure de noyau de céphalosporine (B). Structure de base monobactame (C). Structure de base Carbapeneme (D).	18
Figure I.12 :	Inactivation enzymatique par les Bêta-Lactamases de l'antibiotique Bêta-Lactamines.	19
Figure I.13 :	Modification du site des PBP liant les antibiotiques Bêta-lactame.	19
Figure I.14 :	Efflux actifs à travers les pompes des antibiotiques Bêta-Lactamines.	20
Figure I.15 :	Altération de la production des porines membranaires.	21
Figure I.16 :	Espaces de secretion des bêta-lactamases chez les bactéries à Gram positif et à Gram négatif.	23
Figure I.17 :	Architecture des métallo-bêta-lactamases B1, B2 et B3. Le pli $\alpha\beta\alpha$ commun des MBLs représentatifs est coloré du N (bleu clair) vers l'extrémité C (rouge clair) et est représenté à côté d'une vue rapprochée du site actif (encadré). Les ions zinc (gris) et les molécules d'eau (rouge) sont représentés comme des sphères. Les liaisons de coordination du zinc sont représentées par des tirets gris, les résidus correspondants (étiquetés) étant représentés par des bâtonnets. (A) B1 BcII, (B) B2 Sfh-I, et (C) B3 L1.	29
Figure I.18 :	Structure du tétramère Stenotrophomonas maltophilia L1 reconstituée à l'aide de rubans. Les ions zinc sont représentés par des sphères grises. Les sous-unités individuelles sont identifiées par des couleurs.	30
Figure I.19 :	Structures de sites de liaison métallique de membres représentatifs des MBLs. (a) Mono-Zn (II) BcII provenant de B. cereus (B1); (b) Di-Zn (II) BcII de B. cereus (B1); (c) Mono-Zn (II) CphA provenant de A. hydrophila (B2); (d) L1 provenant de S. maltophilia (B3).	31
Figure I.20 :	Mécanisme d'hydrolyse des bêta-lactamines par une MBL de la sous-classe B1 (BCII mononucléaire) 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 bêta-lactames (ouverture du cycle), (3): dissociation du complexe produit-enzyme.	33
Figure I.21 :	Mécanisme d'hydrolyse des bêta-lactamines par une MBL de la sous-Classe B1 (BCII bi-nucléaire) proposé par Karsisiotis et ses collaborateurs	34

(2014). **(1)** : mécanisme de formation du complexe de Mechaelis, **(2)**: mécanisme de clivage de la liaison C-N du cycle β -lactames (ouverture du cycle), **(3)**: dissociation du complexe produit-enzyme .

Figure I.22 :	Epidémiologie ou distribution mondiale des MBLs.	37
Figure I.23 :	Microorganismes isolés d'infections nosocomiales : enquête de prévalence nationale 2001, France.	38
Figure III.1 :	Schéma d'ensemble des différentes méthodes de la modélisation moléculaire.	67
Figure III.2 :	Spectres FT-IR expérimentales et théoriques de H_2L^2 , H_2L^3 , H_2L^4 et H_2L^5 .	76
Figure III.3 :	Spectres électroniques expérimentaux et calculés de H_2L^2 , H_2L^3 , H_2L^4 et H_2L^5 .	80
Figure III.4 :	Structures optimisées de H_2L^2 , H_2L^3 , H_2L^4 et H_2L^5 avec la numérotation des atomes calculée à partir de la méthode B3LYP/6-31G (d, p).	81
Figure III.5 :	Schéma des orbitales HOMO, LUMO des ligands H_2L^2 , H_2L^3 , H_2L^4 et H_2L^5 obtenues avec la méthode DFT-B3LYP/6-31G (d, p).	85
Figure III.6 :	La distribution de la charge atomique Mulliken de H_2L^2 , H_2L^3 , H_2L^4 et H_2L^5 .	90
Figure. III.7 :	(A) La surface totale de densité d'électrons cartographiée avec le tracé du potentiel électrostatique (MEP) de H_2L^2 , H_2L^3 , H_2L^4 et H_2L^5 . Isovalue = 0,0004. Niveau de calcul: B3LYP / 6-31G (d, p) ; (B) La surface de potentiel électrostatique et (C) la carte de contour du potentiel électrostatique de H_2L^2 , H_2L^3 , H_2L^4 et H_2L^5 .	93
Figure IV.1 :	Les zones d'inhibitions de la croissance de la bactérie <i>Acinetobacter baumannii</i> sur Gélose Mueller Hinton, après 16 à 18 h d'incubation en présence d'imipénème seul (10 μ g) et d'imipénème (10 μ g) plus EDTA (1900 μ g). IMP = Imipénème.	104
Figure IV.2 :	Courbe d'étalonnage tracée en fonction de concentration croissante de BSA et les absorbances relatives à 595 nm (Moyenne \pm SD de trois mesures).	105
Figure IV.3 :	Evolution de l'absorbance de (A) : 80 μ M céphaloridine; (B) : 100 μ M pénicilline et (C) : 120 μ M imipénème en présence de 10 μ l d'extrait semi-purifié à partir de <i>A.baumannii</i> .	106
Figure IV.4 :	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 <i>A.baumannii</i> : (A) en présence et en absence de concentrations fixes d'acide clavulanique ; (B) et d'EDTA.	107
Figure IV.5 :	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'imipénème par l'extrait semi-purifié à partir de <i>A.baumannii</i> et l'inverse de concentrations de ces antibiotiques.	109
Figure IV.6 :	Evolution de l'absorbance de 75 μ M H_2L^2 ; de 150 μ M H_2L^3 , de 200 μ M H_2L^4 et de 150 μ M H_2L^5 en présence de 80 μ M de céphaloridine et de 10 μ l d'extrait semi-purifié de MBL à partir de <i>A.baumannii</i> .	110
Figure IV. 7:	Courbes de saturation tracées en fonction de concentrations croissantes de ligands base de Schiff et des pourcentages d'inhibition de l'extrait semi-purifié de MBL.	111
Figure IV.8:	les valeurs de concentration inhibant 50% (IC_{50}) de l'activité de l'extrait semi-purifié de beta-lactamases à partir de <i>A.baumannii</i> et courbes Logit-Log dans le cas de H_2L^2 , H_2L^3 , H_2L^4 et H_2L^5 .	112
Figure IV.9 :	Les valeurs d' IC_{50} de H_2L^2 , H_2L^3 , H_2L^4 et H_2L^5 avec l' IC_{50} de l'EDTA de l'activité de l'extrait semi-purifié de beta-lactamases. Les résultats sont des moyennes \pm écart-type (n = 3 réplicats indépendants). Signification statistique	113

de la différence par rapport aux valeurs correspondantes des incubations de contrôle: *** P <0,001.

- Figure IV.10 :** 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 (◆) et en présence (■) de concentrations fixes de H₂L² (a), de H₂L³ (b), de H₂L³ (c), ou de H₂L⁴ (d) et l'inverse des concentrations de céphaloridine. **114**
- Figure IV.11 :** Test de sélectivité. **116**
- Figure IV.12 :** Test de sélectivité des ligands H₂L et leurs complexes Zn(II)L. **118**
- Figure IV.13 :** Les zones d'inhibitions de la croissance de la bactérie *Acinetobacter baumannii* sur Gélose Mueller Hinton, après 24 h d'incubation en présence des ligands H₂L et leurs complexes correspondants Zn(II)L. **120**

Liste des tableaux

Tableau I.1 :	Structures des ligands bases de Schiff selon la littérature.	8
Tableau I.2 :	Quelques exemples des ligands bases de Schiff et leurs complexes dans l'application biologiques.	14
Tableau I.3 :	Quelques exemples des ligands bases de Schiff et leurs complexes dans l'application biologiques.	15
Tableau I.4 :	Classifications structurales et fonctionnelle des bêta-lactamases selon Ambler (1980) et selon Bush-Jacoby-Meideros (1989).	21
Tableau I.5 :	Classification de Bush des MBLs membres du groupe 3.	27
Tableau I.6 :	Résidus d'acides aminés des sites actifs des trois sous-classes MBLs coordonnés avec les ions du zinc.	32
Tableau I.7 :	Exemples d'inhibiteurs des métallo-bêta-lactamases.	35
Tableau II.1 :	Caractéristiques physico-chimiques des ligands $H_2L^1-H_2L^5$.	55
Tableau II.2 :	Caractéristiques physico-chimiques des complexes de zinc $Zn(II)L^1- Zn(II)L^5$.	57
Tableau II.3 :	Résultats de la microanalyse des ligands H_2L^2 et H_2L^5 et leurs complexes $Zn(II)L^2$ et $Zn(II)L^5$.	58
Tableau II.4 :	Principales bandes de vibration en IR des ligands $H_2L^1-H_2L^5$ et leurs complexes $Zn(II)L^1- Zn(II)L^5$.	60
Tableau II.5 :	Bandes d'absorption en UV-Vis des ligands $H_2L^2 - H_2L^5$ et leurs complexes $Zn(II)L^2 - Zn(II)L^5$.	61
Tableau III.1 :	Les principales fréquences de vibration et leurs assignements pour les composés H_2L^2 , H_2L^3 , H_2L^4 et H_2L^5 calculées par la méthode B3LYP/6-31G (d, p).	74
Tableau III.2 :	Transitions électroniques expérimentales et calculées, forces des oscillateurs et leur énergie d'excitation pour H_2L^2 , H_2L^3 , H_2L^4 et H_2L^5 .	77
Tableau.III.3 :	Les paramètres structuraux calculés des ligands H_2L^2 , H_2L^3 , H_2L^4 et H_2L^5 .	82
Tableau III.4 :	Comparaison de HOMO, LUMO, gap énergétique (HOMO-LUMO) et propriétés moléculaires associées des H_2L (a.u).	84
Tableau .III.5 :	Les moments dipolaires électriques (Debye), la polarisabilité (en a.u), les composants β et la valeur β_{tot} de H_2L^2 , H_2L^3 , H_2L^4 et H_2L^5 calculés par B3LYP/6-31G (d, p).	86
Tableau III.6 :	Charges atomiques Mulliken calculées par B3LYP/6-31G (d, p) de H_2L^2 , H_2L^3 , H_2L^4 et H_2L^5 .	87
Tableau.III.7 :	Paramètres thermodynamiques calculés de H_2L^2 , H_2L^3 , H_2L^4 et H_2L^5 en utilisant la méthode B3LYP/6-31G (d, p).	95
Tableau IV.1 :	Valeurs des K_M et des V_m d'hydrolyses de concentrations micro-molaires croissantes finales de Céphaloridine par 10 μ l d'extrait semi-purifié de metallo-betalactamase à partir de <i>A.baumannii</i> en présence de concentration fixes d'acide clavulanique ou d'EDTA ou de NaCl.	108
Tableau IV.2 :	Paramètres cinétiques des métallo-bêta-lactamases avec des antibiotiques bêta-lactames.	109
Tableau IV.3 :	Les valeurs IC_{50} des ligands base de Schiff et de l'EDTA inhibants 50% de l'activité de l'extrait semi-purifié de MBL.	112
Tableau. IV.4 :	Les valeurs de K_M (μ M), des V_m (μ mol/mg/min) d'hydrolyse de concentrations croissantes de céphaloridine par 10 μ l d'extrait semi-purifié à partir de <i>A.baumannii</i> en absence et en présence de concentration fixe de H_2L^2 , de H_2L^3 , de H_2L^4 , ou de H_2L^5 .	115
Tableau IV.5 :	Les souches bactériennes utilisées.	115
Tableau IV.6 :	Effet de différents ligands bases de Schiff et leurs complexes sur les souches bactériennes testées.	119
Tableau IV.7 :	Diamètre des zones d'inhibition des ligands H_2L et leurs complexes $Zn(II)L$.	120

Liste des schémas

Schéma 1 :	Protocole de synthèse de ligand base de Schiff H_2L^1 .	52
Schéma 2 :	Protocole de synthèse de ligands bases de Schiff H_2L^2 et H_2L^3 .	53
Schéma 3 :	Protocole de synthèse du ligand base de Schiff H_2L^4 .	54
Schéma 4 :	Protocole de synthèse du ligand base de Schiff H_2L^5 .	54
Schéma 5 :	Protocole de synthèse des complexes $Zn(II)L^2$ et $Zn(II)L^5$.	55
Schéma 6 :	Protocole de synthèse des complexes $Zn(II)L^1$, $Zn(II)L^3$ et $Zn(II)L^4$	56

Unités et abréviations

Unités et abréviation

a.u	Unité atomique : $1 \text{ au} = 27,211396 \text{ eV} = 219\,474,63\,05 \text{ cm}^{-1}$
Å°	Unité de longueur : $1 \text{ Å}^\circ = 1,000\,015\,01 \times 10^{-10} \text{ m}$
AIM	Adelaide IM ipenmase
BC II	B acillus cereus type II
BlaMBL	B -lactamase M étallo- B eta-Lactamase
BHI	B rain H eart I nfusion
BSA	Albumine S érique B ovine
CBBL	Classe B B eta-Lactamase
CDT	C ombined D isc T est.
Debye	Unité de moment dipolaire : $1 \text{ D} = 3,335\,64 \times 10^{-30} \text{ cm}$.
DIM	D utch IM ipenemase
EDTA	Acide E thylène D iamine T étraacétique
FEZ	F luoribacter E ndogenous Z inc beta-lactamase.
FIM	Florence IM ipenmase
GIM	G erman IM ipenemase
GOB	<i>Chryseobacterium meningosepticum</i> classe B .
G⁺	Gram positif
G⁻	Gram négatif
HEPES	acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
IMP	IM iPénème
ImiS	Im ipénèmase de <i>Aeromonas Sobria</i>
IND	IND ologene M étallo- B êta-Lactamase
KHM	K yorin H ospital M etallo-enzyme
L1	Beta-Lactamase
L2	Beta-Lactamase
MBLs	M étallo- B êta-Lactamases
NDM	N ew D elhi M étallo-bêta-lactamase
PBP	P roteins B inding P enicillins.
PLP	P rotéines L iant la P énicilline
ppm	P artie p ar m illion
SBLs	S érines- B êta-Lactamases
Sfh	<i>Serratia fonticola</i> carbapenem h ydrolase
SDS	Sodium D odedecyl S ulfate
SCF	S elf C onsistent F ield
VIM	V érona I ntegro-encoded M étallo- B êta-Lactamase

Introduction générale

Introduction Générale

En **1928**, Alexander Fleming, un chercheur britannique, découvre la pénicilline et l'extrait à partir d'un champignon appelé *Penicillium notatum*. La rentabilisation de cette molécule fut abandonnée par ce chercheur à cause de son instabilité et les difficultés de sa reproduction et de sa purification en quantité suffisante. Une décennie plus tard, Howard Florey et Ernst Boris Chain (**1939**) reprennent les travaux de Fleming et parviennent à produire la pénicilline à grande échelle, à la purifier, ce qui la rend plus stable et moins toxique. Quatre années plus tard, plus précisément en **1943**, la pénicilline est administrée comme médicament à l'homme plus particulièrement aux soldats des armées alliées, mais restait rare et donc réservée aux militaires. Elle fut commercialisée par les pharmacies en **1946** et permit de guérir pneumonies, méningites et syphilis. Depuis cette date, de nombreux antibiotiques (Aminopénicilline (**1960**) ; Céfoxitine (**1970**) ; Céfotaxime (**1980**) et Carbapénèmes (**1990**)...) du genre pénicilline appelés par la suite bêta-lactamines ont été développés par synthèse, reproduits, purifiés et utilisés intensivement pour traiter les maladies causées par de nombreuses infections bactériennes. Le long de cette utilisation intense à cause de leur spectre d'action large et surtout de leur faible toxicité et de leur tolérance, les bactéries n'ont cessées de développer des mécanismes de résistance vis-à-vis de ces médicaments ¹⁻³ dont le plus répandu est la production d'enzymes d'hydrolyse appelées bêta-lactamases (BLs) capables de désactiver ce genre d'antibiotiques.

Acinetobacter baumannii est l'un des pathogènes nosocomiaux les plus communs parmi toutes les espèces d'*Acinetobacter* ⁴ capable d'induire des maladies se caractérisant par de sérieuses difficultés pour leur traitement. A titre d'exemple, les carbapénèmes insensibles aux sérine-bêta-lactamases, sont considérés comme le médicament de choix pour le traitement de ces maladies, essentiellement causées par les espèces pathogènes mentionnées ci-dessus. Ces derniers commencent cependant à développer leur mécanisme de résistance contre les carbapénèmes principalement par production de métallo-bêta-lactamases (MBLs). Il s'agit en fait d'un type de bêta-lactamases qui nécessitent des ions zinc pour catalyser l'hydrolyse du cycle bêta-lactame des antibiotiques bêta-lactamines. La présence indispensable de ce métal fait des MBLs un groupe d'enzymes hypothétiquement facile à inhiber par les agents chélatants comme les ligands base de Schiff qui coordonnent facilement les ions divalents de métaux de transition tels que le zinc, le fer, le cuivre, le cobalt...etc.

Par ailleurs, la manipulation ou l'utilisation des ligands bases de Schiff et leurs complexes de métaux de transition, entre autres, montre que ces molécules jouent un rôle très important dans plusieurs applications telles que la catalyse ⁵, l'électrocatalyse ⁶, inhibitions

Introduction Générale

d'enzymes ⁷ et de croissance microbienne ⁸. A notre connaissance, les ligands base de Schiff ne sont pas rapportés dans la littérature comme molécules douées d'activité antienzymatique (ou inhibitrice) anti-MBLs.

Le présent travail vise, en premier lieu, à synthétiser et à caractériser cinq ligands base de Schiff et leurs complexes de zinc. Quatre de ces ligands sont symétriques, le N, N'-bis (salicylidéne)-1,2-diaminobenzene (H_2L^2), l'acide N, N'-(1, 2-phenylene) diéthanimidothioïque (H_2L^3), l'acide N, N'-(1, 3-propylidene) diéthanimidothioïque (H_2L^4) et le N, N'-bis (salicylidéne)-1,2-diaminoethane (H_2L^5) et un non symétrique, l'acide N, N'-pyridine-2,3- diyldiéthanimidothioïque (H_2L^1). Les ligands H_2L^1 , H_2L^3 et H_2L^4 sont des nouvelles molécules ; les ligands H_2L^2 , H_2L^5 sont resynthétisée. En second lieu, il vise à mettre en évidence d'éventuels effets inhibiteurs de ceux-ci de l'activité enzymatique d'un extrait semi purifié de MBL préparé à partir d'un isolat clinique d'*Acinetobacter baumannii*. Un éventuel effet antibactérien a été également recherché sur le même isolat clinique.

Le manuscrit relatif à ce travail à la fois bibliographique et expérimental, s'organise en quatre chapitres :

✓ Dans le chapitre **I**, nous rapportons une synthèse de données de la littérature sur les bases de Schiff et leurs complexes de zinc ainsi que sur les bêta-lactamases.

✓ Dans les chapitres **II**, **III** et **VI** nous rapportons les travaux personnels. Le chapitre **II**, est réservé aux méthodes que nous avons appliquées lors de la synthèses et la caractérisation de nos ligands bases de Schiff et de leurs complexes de Zn ainsi qu'aux résultats obtenus et leur interprétation. Le chapitre **III**, est consacré à la définition de la méthode théorique et au logiciel utilisés dans la caractérisation théorique de nos ligands synthétisées et également aux résultats obtenus et leur discussion. Le chapitre **IV**, est consacré au matériel biologique utilisé et aux expérimentations que nous avons réalisé lors de la mise en évidence d'éventuelles effets inhibiteurs de nos ligands de l'activité enzymatique d'un extrait semi purifié de MBL préparé à partir d'un isolat clinique d'*Acinetobacter baumannii* et lors de la mise évidence d'un éventuel effet antibactérien sur le même isolat bactérien clinique. Les résultats obtenus et leur discussion sont également y rapportés.

References bibliographiques

1. S.R. Evans, A.M. Hujer, H. Jiang, K.M. Hujer, T. Hall, C. Marzan, M.R. Jacobs, R. Sampath, D.J. Ecker, C. Manca, K. Chavda, P. Zhang, H. Fernandez, L. Chen, J.R. Mediavilla, C.B. Hill, F. Perez, A.M. Caliendo, V.G. Fowler, Jr, H.F. Chambers, B.N. Kreiswirth, R.A. Bonomo, Rapid molecular diagnostics, antibiotic treatment decisions, and developing approaches to inform empiric therapy: PRIMERS I and II, *Clin.Infect.Dis.* **62** (2016) 181-189.
2. E.P. Abraham, E. Chain, An enzyme from bacteria able to destroy penicillin, *Nature.* **146** (1940) 837-838.
3. K.Kumarasamy, M.A. Toleman, T.R. Walsh, J. Bagaria, F. Butt, R. Balakrishnan, Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: A molecular, biological, and epidemiological study, *Lancet. Infect. Dis.* **10** (2010) 597-602.
4. G. Suresh, Joshi, M. Geeta, B.L. Krishnarao, Niphadkar, S. Vikram, Ghole, Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from a teaching hospital, *J. Infect. Chemother.* **9** (2003) 187-190.
5. W. Al Zoubi, Y. Gun Ko, Schiff base complexes and their versatile applications as catalysts in oxidation of organic compounds: part I, *Appl. Organometal. Chem.* **31** (2016) 1-12.
6. Y. Zidane, A. Ourari, T. Bataille, P. Hapiot, D. Hauchard, Electrochemical study with cavity microelectrode containing clay-supported Mn(III) salen complex - Dioxygen activation with cytochrome P450 model, *J. Electroanal. Chem.* **641** (2010) 64-70.
7. L. Puccetti, G. Fasolis, D.Vullo, Z.H. Chohan, A. Scozzafava, C.T. Supuran, Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of cytosolic/tumor-associated carbonic anhydrase isozymes I, II, IX, and XII with Schiff bases incorporating chromone and aromatic sulfonamide moieties, and their zinc complexes, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **15** (2005) 3096-3101.
8. H .Z. Chohan , H.S. Sumrra, H.M. Youssoufi, B.T.Hadda, Metal based biologically active compounds: Design, synthesis, and antibacterial/antifungal/cytotoxic properties of triazole-derived Schiff bases and their oxovanadium(IV) complexes, *European Journal of Medicinal Chemistry*, **45** (2010) 2739-2747

CHAPITRE I

Rappels bibliographiques

I.1. Chimie de coordination

La chimie de coordination est l'étude de composés ayant un atome central (souvent métallique) entouré de molécules ou d'anions, appelés ligands. Les ligands sont attachés à l'atome central par des liaisons datives, également connues sous le nom de liaisons de coordonnées, dans lesquelles les deux électrons dans la liaison sont fournis par le même atome sur le ligand. Les bases de Schiff sont une classe importante de ligands dans la chimie de coordination et leur capacité de complexation contenant différents atomes donneurs est largement rapportée ¹⁻³.

Les complexes base de Schiff sont considérés comme étant parmi les principaux modèles stéréochimiques les plus importants dans la chimie, en particulier dans la chimie de coordination en raison de leurs accessibilité préparatoire, de géométrie de coordination, de numéro de coordination et de modes d'interaction avec leurs ligands. Les propriétés donneur et accepteur d'électrons du ligand et la position du ligand dans la sphère de coordination avec la réactivité des composés de coordination sont à l'origine de leur large exploration ⁴⁻⁶.

I.2. Bases de Schiff

1.2.1. Définition

Une base de Schiff est toute molécule comportant une fonction imine ($C=N$). Elle est le produit de condensation d'une cétone ou d'un aldéhyde sur une amine primaire ⁷. Dans cette définition la base de Schiff est le synonyme d'azométhine lorsque le carbone n'est lié qu'à un seul hydrogène et possède donc une formule générale $RCH=NR'$. Le groupement imine $C=N$ est lié à travers l'atome d'azote à un groupement aryle ou alkyle et non pas à un hydrogène : ce sont des imines secondaires ⁸.

Le R est un groupement alkyle ou phénylique ce qui rend la base de Schiff une imine stable (Figure I.1). Les bases de Schiff obtenues à partir des aldéhydes aliphatiques sont relativement moins stables et facilement polymérisables ⁹, alors que celles des aldéhydes aromatiques exhibent des effets mésomères induisant une meilleure stabilité ^{10,11}.

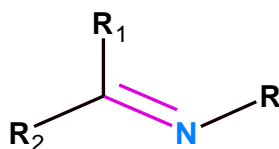
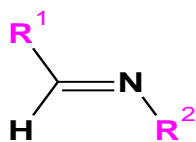


Figure I.1. Structure d'une base de Schiff.

Différents types de bases de Schiff sont rapportés dans la littérature. Selon la nature des radicaux R, R¹ et R², ces composés adoptent des comportements différents, tant sur le plan de leur structure que de leur pouvoir basique ou de leur mode de coordination.

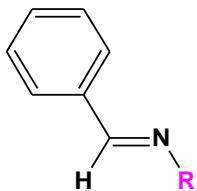
Les bases de Schiff comportant des radicaux alkyle (Figure I.2, structures a) s'avèrent les plus basiques et ont tendance à subir facilement les réactions d'hydrolyse.

La présence d'un ou de plusieurs noyaux aromatiques affecte la basicité du système et lui confère davantage de stabilité dans les milieux aussi bien acides que basiques ¹² (figure I.2, structures b). La présence d'un groupement hydroxyle sur le noyau aromatique de la partie aldéhyde (Figure I.2, structures c et d) établit, dans la molécule, des liaisons hydrogène intramoléculaires (Figure I.3), lui conférant une stabilité et un pouvoir de coordination plus élevés ¹³. De par la diversité de leurs structures, les bases de Schiff sont utilisées dans des domaines aussi divers que la chimie organique, la catalyse, le biomimétisme et la coordination en solution et à l'état solide ^{14,15}.

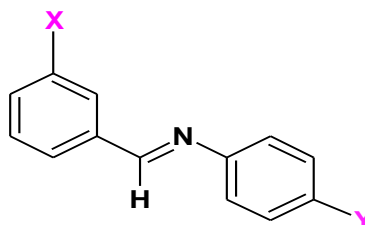


R^1 et $R^2 = CH_3, C_2H_5, \dots$

Structures a

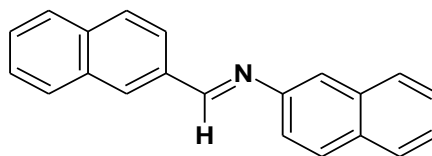
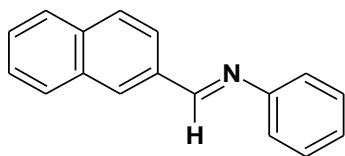


$R = CH_3, C_2H_5, C_3H_8, \dots$

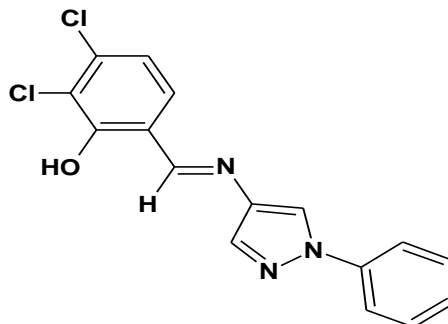
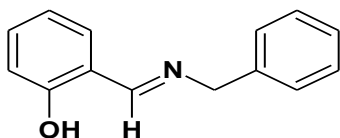
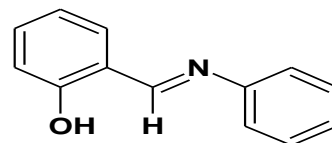
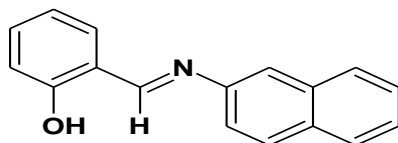


$X = H, NH_2, OCH_3, \dots$

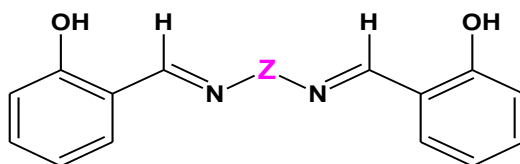
$Y = CH_3, OCH_3, NO_2, \dots$



Structures b



Structures c



$Z =$, , $-CH_2-$, $-CH_2-CH_2-$, CH_2-N-CH_2- , \dots

Structures d

Figure I.2. Exemples de bases de Schiff décrites dans la littérature ^{12,13}.

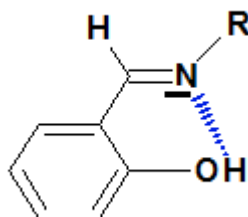


Figure I.3. Liaison hydrogène intramoléculaire stabilisant les bases de Schiff dérivées de l'aldéhyde salicylique

I.2.2. Synthèse

La méthode la plus courante pour préparer les imines est la réaction originale découverte par Schiff ¹⁶. Fondamentalement, elle consiste en la réaction d'un aldéhyde (respectivement une cétone) avec une amine primaire accompagnée d'élimination d'une molécule d'eau (Figure I.4). Cette réaction peut être accélérée par catalyse acide et est généralement réalisée dans un milieu alcoolique et souvent sous reflux.

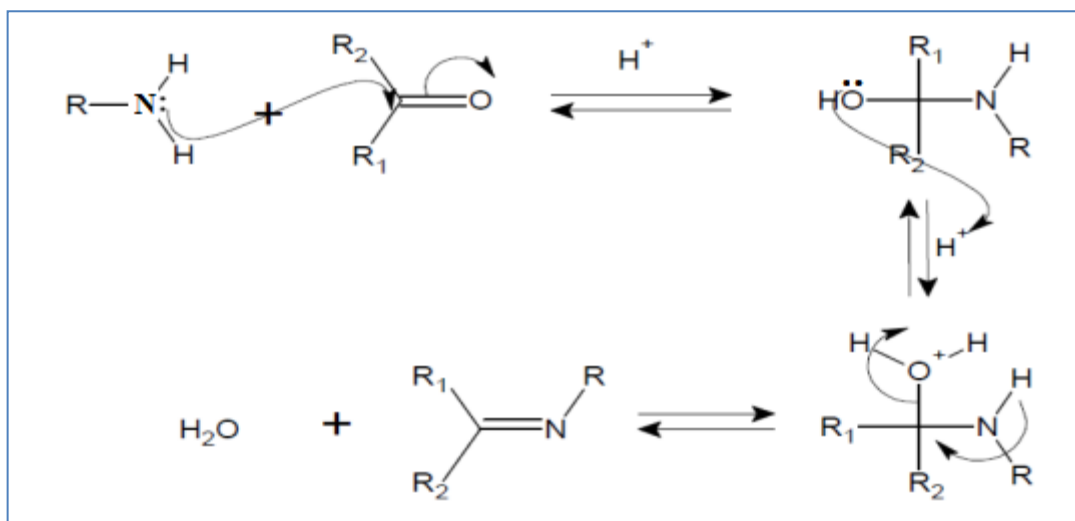
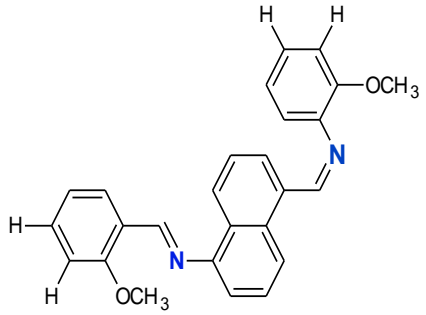
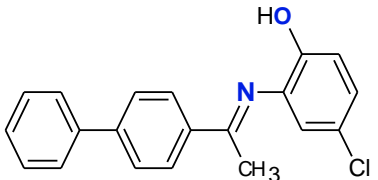
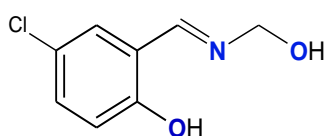
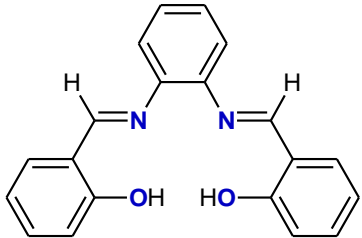
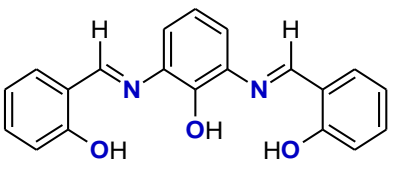


Figure I.4. Réaction de formation d'une base de Schiff.

I.2.3. Classification

Les ligands bases de Schiff sont doués d'une aptitude à former des liaisons de coordination avec les métaux de transition et peuvent être classés selon leur nombre de sites coordinats, en mono, bi, tri, tétra ou pentadentates, etc (Tableau I.1).

Tableau I.1. Structures des ligands bases de Schiff selon la littérature.

Structure	Site donneur d'électron	Référence
	[N]	M. Köse et coll. ¹⁷
	[N,O]	C. Karakaya et coll. ¹⁸
	[O, N, O]	E. Gungor et coll. ¹⁹
	[N, N, O, O]	P.A.Vigato et S.Tamburini ²⁰
	[N, N, O, O, O]	Mikuriya et A.Kawamori ²¹

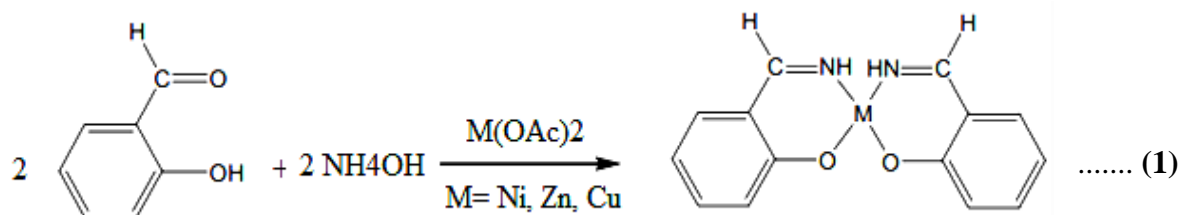
I.3. Complexes métal-bases de Schiff

I.3.1. Généralités

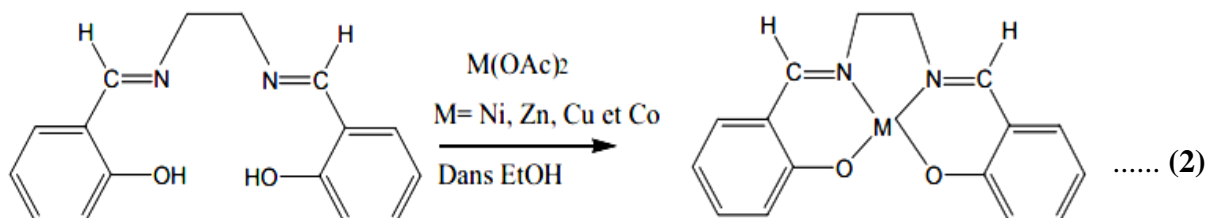
Les métaux de transition sont les plus utilisés pour l'obtention de complexes base de Schiff intéressants du point de vue stabilité, intérêt et versatilité de leurs applications, leurs synthèses et leurs études dans différents domaines restent encore d'actualité. Il est connu que

la présence d'ions métalliques liés à des composés biologiquement actifs peut améliorer considérablement leurs activités ¹⁶.

Les premiers complexes de ligands bases de Schiff furent obtenus par Pfeiffer en **1931** et c'est à partir de cette date que la synthèse des complexes de ligands bases de Schiff devienne systématique. Les premiers complexes de cette famille ont été obtenus selon l'équation 1 suivante :



Les premiers complexes de ligands base de Schiff tétradentates avec un pont éthylène, usuellement appelés Salen, ont été obtenus par Pfeiffer et Tsumaki (**1932**) ²² ; ils ont préparé des complexes de cuivre, de nickel et de zinc, suivant l'équation 2 ci-dessous :



Comme notre travail s'articule sur les complexes de zinc tétradentates de type N_2O_2 , la recherche bibliographique qui suit sera consacré à cette famille de composés.

I.3.2. Complexes de zinc-bases de Schiff

I.3.2.1. Complexes de zinc non symétriques

En **2010**, dans notre laboratoire, Ouari et coll. ²³ ont synthétisé un complexe de zinc base de Schiff (Zn(II)-BS) non symétriques utilisant la 2,3-diaminopyridine comme pont. L'unité asymétrique comporte deux complexes mononucléaires de zinc (II) (Figure I.5).

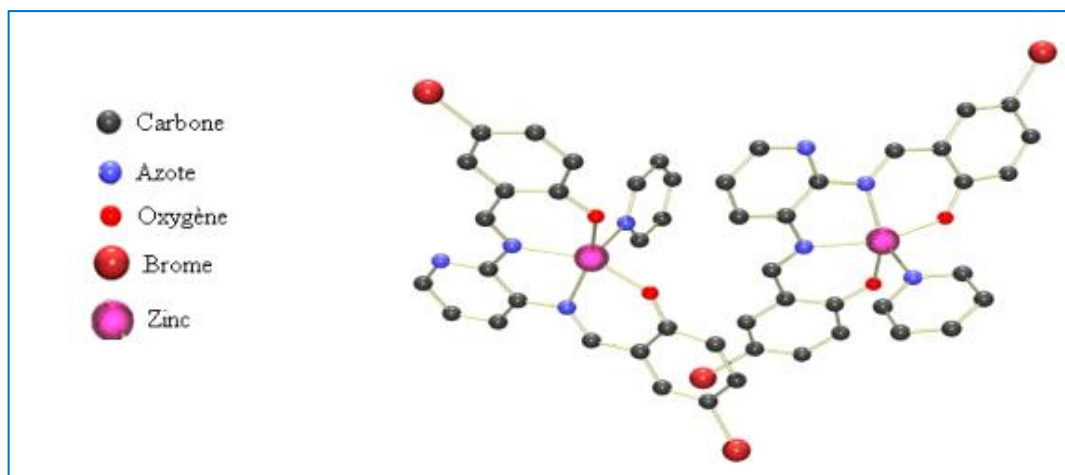


Figure I.5. Structure de l'unité asymétrique comportant les deux complexes de Zn(II)-BS ²³.

D'autres travaux concernant la recherche de nouveaux complexes de zinc non symétrique (ZnL) ont été étudiés par Sobha et coll. (2012) ²⁴. Ces auteurs ont procédé par la réaction de 1,4-diamino-butane, 2-hydroxy-benzaldéhyde avec de l'o-acétotoluidine.

Un complexe de zinc $\text{Na}_2[\text{ZnL}](\text{H}_2\text{O})_n$ avec un nouveau ligand base de Schiff, tétradentate de type N_2O_2 a été synthétisé, caractérisé et identifié par les différentes techniques spectrales par Asadi et coll.(2014) ²⁵. Dans ce complexe la dissymétrie apparaît au niveau du pont.

Récemment, en 2015, Mahsa Khorshidifard et ces collaborateurs ²⁶ ont synthétisé un complexe de zinc base de Schiff (ZnL_2) ($\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2\text{Zn}$) non symétrique utilisant salicylaldehyde et Allylamine, caractérisé et identifié par les différentes techniques spectrales (Figure I.6).

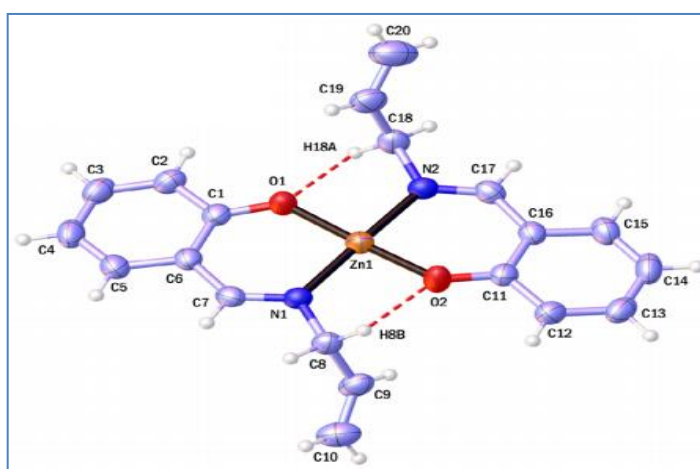


Figure I.6. Présentation ORTEP ZnL_2 , les atomes H sont montrés comme de petites sphères de rayons arbitraires. Les liaisons hydrogène sont représentées par des lignes en pointillés ²⁶.

En 2016, Karakayaa et coll. ¹⁸ ont synthétisé un complexe de zinc base de Schiff ZnL_2 non symétrique utilisant 4-chloro-2-[1-(4 phénylphényl) ethylideneamino] phenol et Et_3N , (Figure I.7).

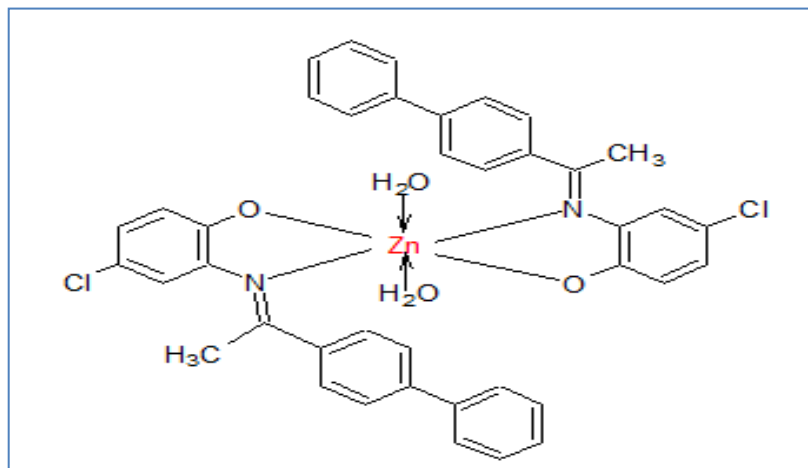


Figure I.7. Structure proposée du complexe ZnL_2 ¹⁸.

En 2018, Mousavi et coll. ²⁷ ont synthétisé un complexe de nitrate de zinc cationique nanostructuré de formule $[ZnLNO_3] NO_3$ (où $L = (N_2E, N_2'E) -N1, N1' -$ (éthane-1,2-diyl) bis ($N2 - ((E) -3$ phénylallylidène) éthane-1,2-diamine)) a été préparé par procédé sono chimique et caractérisé par cristallographie aux rayons X monocristalline, par microscopie électronique à balayage (SEM), par spectroscopie FT-IR et RMN et par diffraction des rayons X sur poudre (XPRD). L'analyse aux rayons X démontre la formation d'un complexe cationique, dont le centre métallique est cinq-coordinat par quatre atomes d'azote du ligand base de Schiff et un atome d'oxygène du groupe nitrate (Figure 1.8).

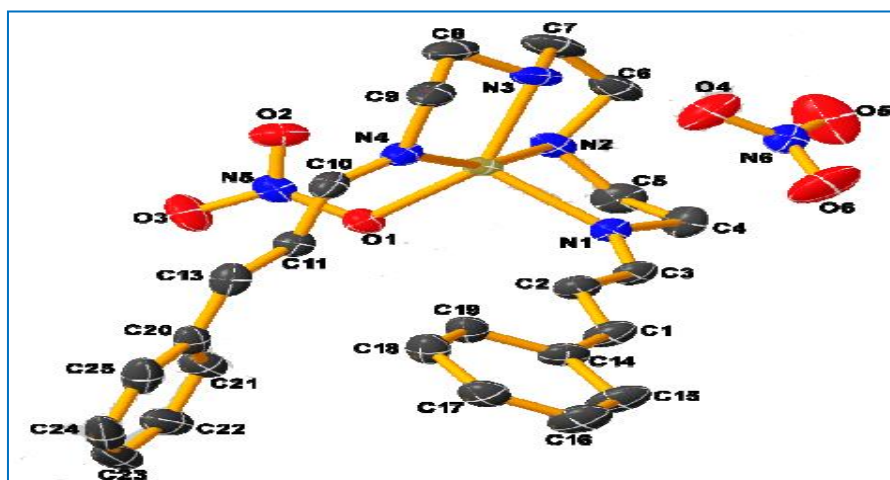


Figure 1.8. La structure cristalline du complexe $[ZnL(NO_3)_2] NO_3$ avec schéma de numérotation atomique ²⁷.

I.3.2.2. Complexes de zinc symétriques

Dans la suite de ces études sur les complexes de zinc, en 2017, Shahraki et Heydari ²⁸ ont procédé à la synthèse d'un ligand tétradentate symétrique, à partir de la condensation, dans le rapport molaire de 2:1, de diacétyl monoxime avec 2,2-diméthyl-1,3-propanediamine.

En 2018, Rajaei et Nezamoddin Mirsattari ²⁹ ont procédé à la synthèse d'un nouveau ligand tétradentate symétrique N, N'-bis (4-hydroxysalicylidene)-1,4-phenylenediamine à partir de la condensation, dans le rapport molaire de 2:1, de 2,4-dihydroxybenzaldehyde avec 1,4-phenylenediamine (Figure I.9). Ce dernier a été caractérisé par les différentes techniques spectroscopiques telles que l'IR, UV-Vis, RMN-H¹ et RMN-C¹³. Le complexe de Zn(II) forme une géométrie octaédrique.

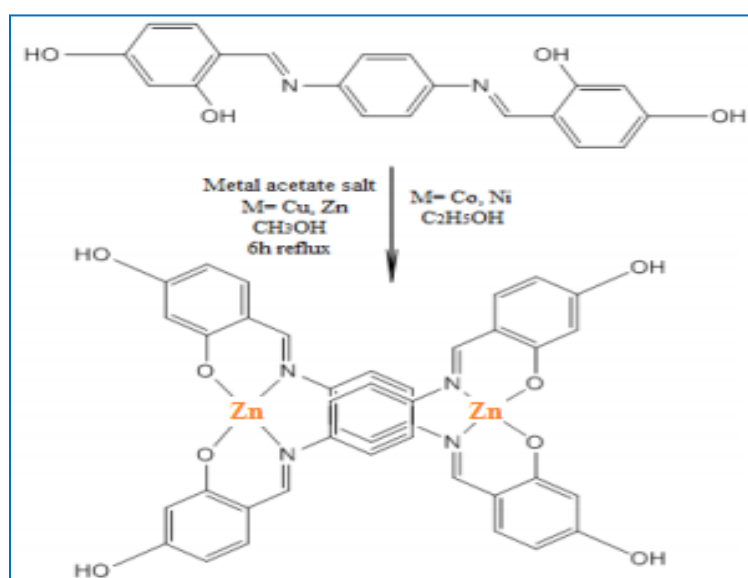


Figure 1.9. La structure du complexe Zn(II) et son précurseur ²⁹.

I.4. Applications et activités biologiques des ligands bases de Schiff et de leurs complexes

Les ligands bases de Schiff et de leurs complexes sont, entre autres, des composés organiques d'une large utilisation. Ils servent de colorants, de pigments, de catalyseurs chimiques, d'intermédiaires dans la synthèse organique et de polymères de stabilisation ^{30, 31}. Ils sont doués également de nombreuses activités biologiques incluant les activités antifongique, antibactérienne, antitumoral, anti-inflammatoire, trypanocide, antiproliférative, anti-HIV, antimalarial et antienzymatique ³². Sur le plan relation structure-activité, la présence du groupe imine dans la structure de ces composés est essentielle pour leurs activités biologiques ³³. Cette partie structurale de la molécule a été extensivement explorée en vue de développer de nouvelles substances bioactives ³⁴.

I.4.1. Activité antienzymatique

L'activité antienzymatique ou plus précisément inhibitrice d'enzymes des ligands bases de Schiff et de leurs complexes a été testée sur une large gamme d'enzymes souvent à des fins thérapeutiques (antiseptique, antimicrobienne, antitumorale, anti-infectieuse, antiviral...) incluant des métallo-enzymes (Carbonique Anhydrase, Protéases à zinc, Cytochrome P-450, Aldehyde oxidase, Peroxydases, Hydrogenase, Methylmalonate isomérase, Kinases, Acetylsynthétase...) et des non-métallo-enzymes (Thermolysine, Thrombine, Urease, Carbapenemases...).

Type d'enzymes confondus, les mécanismes d'inhibition peuvent être :

- Une chélation du métal des sites actifs de ces enzymes bloquant ainsi son rôle dans la catalyse et/ou la liaison du métal de la molécule inhibitrice à des groupements chimiques des résidus d'acide aminé du site actif de l'enzyme (groupement sulfhydryl d'une cystéine, l'azote de l'histidine, l'oxygène de l'aspartate et du glutamate) empêchant l'interaction du substrat avec celui-ci ou à des résidus d'acides aminés extra-site actif modifiant la géométrie de celui-ci rendant apparemment difficile l'accès du substrat au site actif ^{35,36}.
- Les ions du métal (exemple le cuivre) peuvent inhiber les enzymes soit par leur polymérisation soit par blocage des groupements thiol soit par liaison aux résidus histidines du site actif ³⁷.
- Une éventuelle liaison hydrogène entre le groupe hydroxyle présent dans les ligands bases de Schiff et un résidu d'acide aminé dans le site actif.

Le tableau I.2 regroupe les ligands bases de Schiff et de leurs complexes inhibiteurs de métallo-enzyme (carbonique anhydrase) et de non-métallo-enzyme (urease).

Tableau I.2. Exemples de ligands bases de Schiff et de leurs complexes Inhibiteurs d'enzymes.

Activité antienzymatique			
<i>Metallo-enzymes</i>			
<u>Ligands / Complexes</u>	<u>Enzyme</u>	<u>IC₅₀ / K_i</u>	<u>Ref</u>
bases de Schiff dérivés de sulfonamides aromatiques et leurs complexes de Zn (II).	Carbonique Anhydrase	K _i = 13 -100 nM	P. Luca et al, 2005 ³⁹
bases de Schiff dérivés de sulfonamides.		K _i = 65 - 325 nM	Mahmood-UI et al, 2008 ³⁵
bases de Schiff dérivés de l'imino-méthyl-naphtalène-2-ol		IC ₅₀ = 2,40 ± 0,12 mM.	A. Saghir et al, 2017 ³⁶
<i>Non-Metallo-enzymes</i>			
Complexes de Cu (II)		IC ₅₀ = 0.43 - 2.39 μM	Yu-GuangLi et al, 2007 ⁴⁰
Base de Schiff dérivés d'hydrazone		IC ₅₀ = 0.102 - 0.127 μM	Aslam et al, 2011 ⁴¹
Complexe de Co (II)	Urease	IC ₅₀ = 16 μM	Dong et al, 2011 ⁴²
Complexes de Cu (II), de Ni (II), de Zn (II) et de Co (II) de ligands de base de Schiff dérivés du 3,5-dibromosalicylaldehyde /3,5-dichlorosalicylaldehyde		IC ₅₀ = 1.51 - 3.52 μM	Yongming Cui et al, 2012 ⁴³
Base de Schiff dérivés de thiosemicarbazide		IC ₅₀ = 0.58 - 4.84 μM	Saeed et al, 2014 ⁴⁴
Base de Schiff dérivés de l'isophthalaldehyde.		IC ₅₀ = 13.8 -18.3 μM	Rahim et al, 2016 ⁴⁵

I.4.2. Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des ligands bases de Schiff et de leurs complexes a été testée sur de nombreuses espèces bactériennes (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Streptococcus*, *Enterobacteriaceae* ...) à des fins thérapeutiques. Le ou les mécanismes moléculaires et même généraux de cette activité biologique sont rarement rapportés dans la littérature. Dans le peu de cas contraire, ils sont souvent définis comme étant bactériostatiques ou bactéricides et parfois légèrement commenté sur le plan moléculaire ³⁸. Ils suggèrent que la chélation pourrait faciliter la capacité d'un complexe métallique à traverser une membrane cellulaire et exercer son action antibactérienne.

Le tableau I.3 regroupe les ligands bases de Schiff et de leurs complexes inhibiteurs de la croissance bactérienne.

Tableau I.3. Exemples de ligands bases de Schiff et de leurs complexes Inhibiteurs d'enzymes et de croissance bactérienne.

Activité antibactérienne			
<u>Ligands/Complexes</u>	<u>Espèce bactérienne</u>	<u>CMI/CMB</u>	<u>Ref</u>
bases de Schiff dérivé du fluorobenzaldéhyde et des triazoles et leurs complexes de Co (II), Ni (II), Cu (II) et Zn (II)	<i>S. aureus</i> <i>S. epidermidis</i> <i>B. subtilis</i> , <i>S. typhi</i> <i>P. aeruginosa</i>	CMI = 2 -16 mg/ml.	S. Kiran et al, 2006 ³⁸
Base de Schiff dérivée du 2-hydroxy-4 méthoxybenzaldéhyde	<i>E. coli</i> <i>S. enteritidis</i> <i>S. aureus</i> <i>Enterococcus</i> <i>C. albicans</i>	CMI > 10 mM CMB > 10 mM	P. Elena et al, 2015 ⁴⁶
Base de Schiff dérivés de la morpholine et leurs complexes de Cu (II).	<i>C. violaceum</i> <i>S. flexneri</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P.aeruginosa</i> <i>S.pyogenes</i>	CMI= 4 - 10 mM	Karuthamohamed et al, 2018 ⁴⁷

S. aureus : *Staphylococcus aureus* ; *E. Coli* : *Escherichia coli* ; *S. enteritidis* : *Salmonella enteritidis* ; *C. Albicans* : *Candida albicans* ; *S. epidermidis* : *Staphylococcus epidermidis* ; *B. Subtilis* : *Bacillus subtilis* ; *S. typhi* : *Salmonella typhi* ; *P. aeruginosa* : *Pseudomonas aeruginosa*

- **CMI** : Concentration minimale inhibitrice ; **MBC** : Concentration minimale bactéricide.

I.5. Résistance bactérienne et bêta-lactamines

I.5.1. Bêta-lactamines

Il s'agit d'antibiotiques les plus utilisés dans le traitement des infections bactériennes à cause de leur large spectre d'activité et leur faible toxicité ^{48, 49}. Ces antibiotiques agissent en inhibant un groupe d'enzymes appelées transpeptidases (appelées également protéines liant la pénicilline ou PLP) qui sont essentielles dans la synthèse du peptidoglycane de la paroi cellulaire bactérienne ⁵⁰.

Du fait de leur prescription fréquente, les bêta-lactamines sont à utiliser raisonnablement afin de prévenir l'émergence de souches résistantes (bêta-lactamases à large spectre et carbapénémase). L'OMS a publié au début de **2017** une liste des agents prioritaires pour la recherche et le développement de nouvelles molécules avec pour priorité

A. baumannii, *P. aeruginosa*, Enterobacteriaceae productrices de carbapénèmes ou de bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE).

Depuis la découverte par Alexander Fleming de la pénicilline en **1929**, les antibiotiques ont révolutionné la santé humaine à l'échelle mondiale. L'antibiothérapie peut être reconnue pour une augmentation significative de l'espérance de vie entre **1944** et **1972**, une période de recherche intensive et réussie sur les antibiotiques ⁵¹. Cependant, les effets négatifs de l'antibiothérapie sont bien documentés, notamment la résistance bactérienne, qui est maintenant acceptée comme un problème mondial d'ordre médical, économique et environnemental.

Les bêta-lactamines constituent une famille d'antibiotiques très homogène aux plans structural, pharmacologique et thérapeutique. Elles se caractérisent toutes par un élément structural commun, le noyau bêta-lactame, d'où leur nom. Ce sont aujourd'hui des antibiotiques incontournables et souvent prescrits. Le risque principal de leur utilisation est la survenue possible d'allergie.

A partir du noyau bêta-lactame de base (Figure I.10), quatre familles de bêta lactamines ont été développées ^{52, 53} : les pénams (pénicillines), les céphems (céphalosporines), les pénems (carbapénèmes), et les monobactams (Figure I.11).

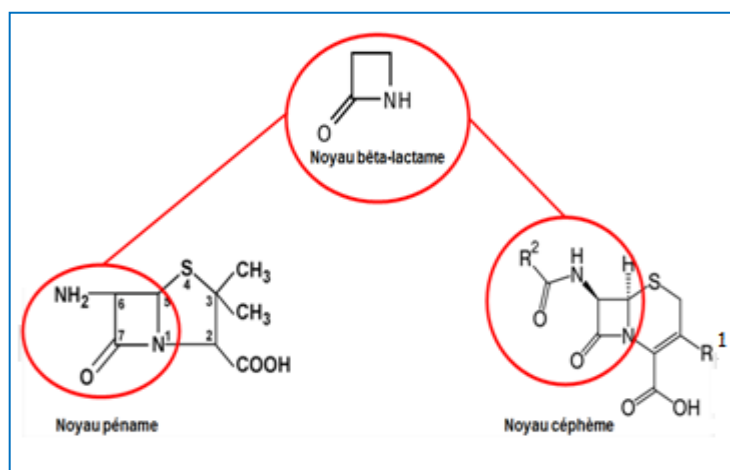


Figure I.10. Structures de base des bêta-lactamines.

(1) Les pénames (pénicillines)

Il s'agit d'un groupe de molécules ayant en commun le noyau pénème, qui est caractérisé par un pentacycle saturé (cycle thiazolidine) associé au noyau bêta-lactame. Selon

la nature de la chaîne latérale, il existe plusieurs sous-classes pénicillines, dont les plus utilisées sont les aminopénicillines (ampicilline, amoxicilline), les carboxypénicillines (ticarcilline) les uréidopénicillines (pipéracilline) et les amidinopénicillines (pivmecillinam) ⁵⁴.

Les pénicillines se présentent en général sous forme de poudres blanches. Elles possèdent un caractère acide à cause de la fonction acide carboxylique (Figure I.11, A). De ce fait, elles peuvent donc se trouver sous forme acide ou sous forme de sels. Elles seront donc solubles soit dans des solutions organiques apolaires, soit dans des solutions aqueuses. Elles sont utilisées pour traiter les infections bactériennes due aux bactéries à Gram positif aérobies (*Streptococcus sp.*, *S. pyogenes* (pneumocoque du groupe A) et aux bactérie à Gram négatif aérobies (*Neisseria meningitidis/N. Gonorrhoeae*) et aux autres bactéries (*Treponema sp.* (Pian – Syphilis) /*Leptospira sp.*).

(2) Les céphalosporines

Leur noyau de base associe un cycle bêta-lactame à un cycle dihydrothiazine pour former le noyau céphème (Figure I.11, B). La particularité du noyau céphème et les nombreux radicaux de substitution proposés expliquent les propriétés antibactériennes différentes des céphalosporines, justifiant leur distinction fonctionnelle en plusieurs générations (1^{ère}, 2^{ème}, 3^{ème}, 4^{ème} et 5^{ème} générations), de spectre et d'intérêt clinique variables ⁵⁴. Elles sont stables en milieu acide mais présentent une instabilité en milieu alcalin supérieure à celle des pénicillines. Les céphalosporines sont une classe d'antimicrobiens utilisés pour traiter les infections bactériennes due aux bactéries Gram-négatives. Cette classe d'antibiotiques est administrée pour traiter les infections nosocomiales en particulier pour éradiquer les infections provoquées par les Enterobacteriaceae, par ex. *K. pneumoniae* et *E.coli*.

(3) Les monobactames

Les monobactames, ne contiennent pas de système cyclique condensé et sont constitués du cycle bêta-lactame avec un groupe acide sulfonique lié à la position analogue du groupe carboxylate trouvé dans les pénicillines et les céphalosporines ⁵⁵ (Figure 1.11, C). L'aztréonam est le seul monobactame commercialisé ⁵⁴. Il montre une très bonne activité contre les bactéries à Gram négatif aérobies et plus particulièrement contre les entérobactéries, pour lesquelles il possède une activité comparable à celle des céphalosporines de troisième génération en raison de sa bonne stabilité vis-à-vis des bêta-lactamases ⁵⁴.

(4) Les pénèmes (Les carbapénèmes)

Les carbapénèmes sont constitués d'un anneau lactame fusionné à un anneau à cinq membres semblable à la pénicilline qui a un carbone remplaçant le sulfure et contient également une double liaison (Figure 1.11, D). Une autre caractéristique importante des carbapénèmes est la résistance à l'inactivation par les serine bêta-lactamases, et agissent comme des inhibiteurs de nombreuses bêta-lactamases. Les carbapénèmes possèdent un large spectre d'activité contre les bactéries Gram-positives et Gram-négatives et constituent un groupe d'antibiotiques de plus en plus essentiel pour le traitement des infections causées par des bactéries multirésistantes ⁵⁶.

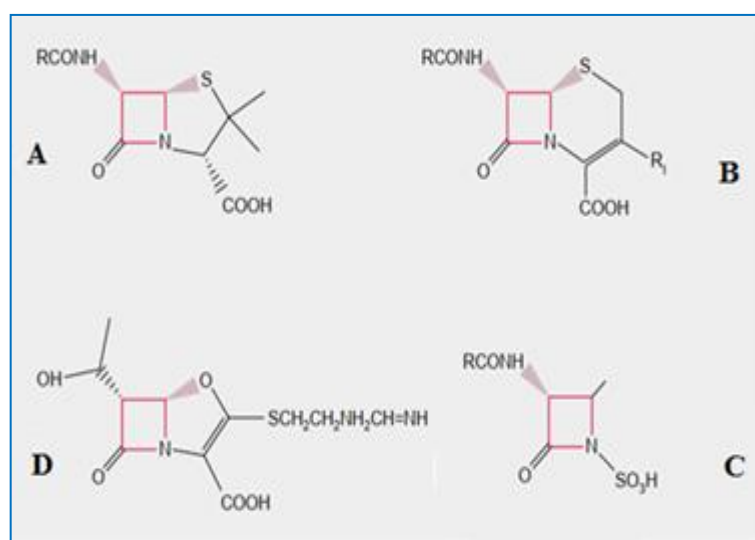


Figure I.11. Structure de base des pénicillines (A), des céphalosporines (B), des monobactames (C) et des Carbapenèmes (D).

I.5.2. Mécanismes généraux de résistance bactérienne aux bêta-lactamines

Les bactéries ont développé avec le temps différents mécanismes afin de neutraliser l'action de ces agents antibactériens. Il s'agit de l'inactivation enzymatique de l'antibiotique, de la modification ou le remplacement de sa cible, de l'efflux actif ou encore la pénétration réduite de la molécule. D'autres mécanismes tels que la protection ou la surproduction de la cible de l'antibiotique sont également décrits. Ils sont, cependant, plus rares et surtout associés à certaines classes de composés ⁵⁷.

a. Inactivation enzymatique

L'inactivation enzymatique représente le principal mécanisme de résistance des bactéries aux bêta-lactamines. Le principe de ce mécanisme est la sécrétion par la bactérie d'un groupe d'enzymes d'hydrolyse en l'occurrence les bêta-lactamases qui en modifiant le noyau bêta-

lactame actif de l'antibiotique par clivage, empêchent la fixation de ce dernier sur sa cible et provoque une perte d'activité ⁵⁸ (Figure I.12).

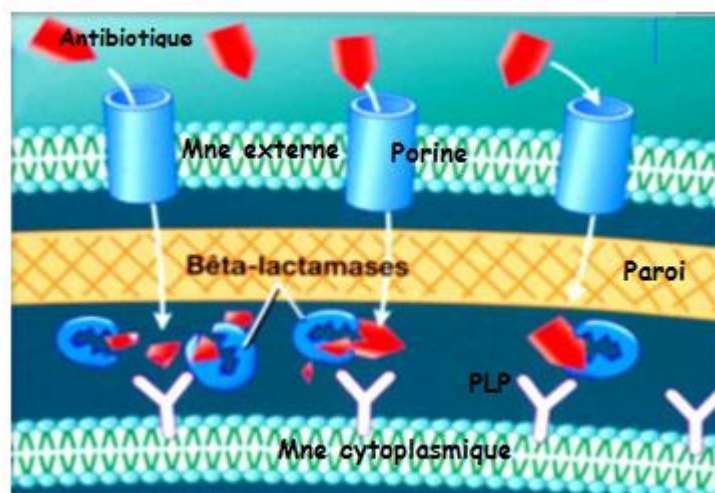


Figure I.12. Inactivation enzymatique par les Bêta-Lactamases de l'antibiotique Bêta-Lactamine ⁵⁹.

b. Modification de la cible de l'antibiotique

La cible des bêta-lactamines à savoir les transpeptidases appelées également protéines liants les pénicillines (PLP) ou protéines binding penicillins (PBP) peut être structurellement modifiée par la bactérie, de telle sorte que le composé antibactérien ne puisse plus s'y lier et exercer son activité au niveau de la bactérie ⁵⁸ (Figure I.13).

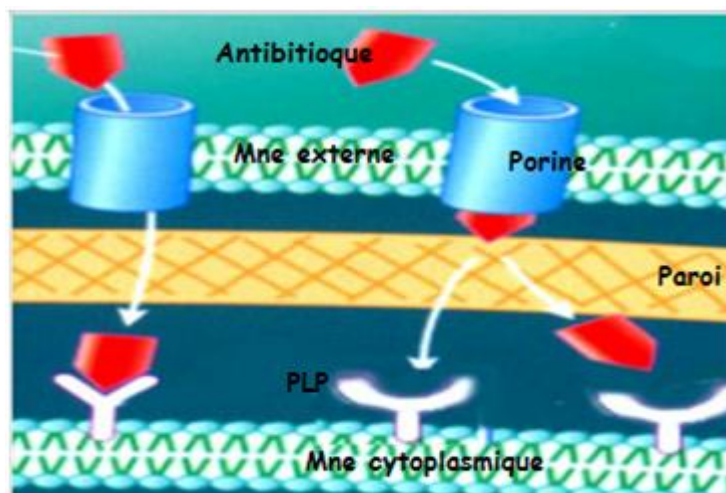


Figure I.13. Modification du site des PBP liant les antibiotiques Bêta-lactamines ⁶⁰.

c. Efflux actif

L'efflux actif, médié par des protéines transmembranaires connues sous le terme de pompes à efflux ou transporteurs actifs, est un mécanisme nécessitant de l'énergie et est utilisé par les bactéries, par les cellules eucaryotes dont notamment les protozoaires, pour expulser à l'extérieur des métabolites et des composés toxiques étrangers tels que les antibiotiques et d'autres médicaments. Ces pompes à efflux ont généralement une spécificité de substrats assez large, et seulement certaines d'entre elles confèrent une résistance aux antibiotiques. La résistance provient de la réduction de concentration en antimicrobien dans le cytoplasme de la bactérie, ce qui prévient et limite l'accès de l'antibiotique à sa cible ⁶¹ (Figure I.14).

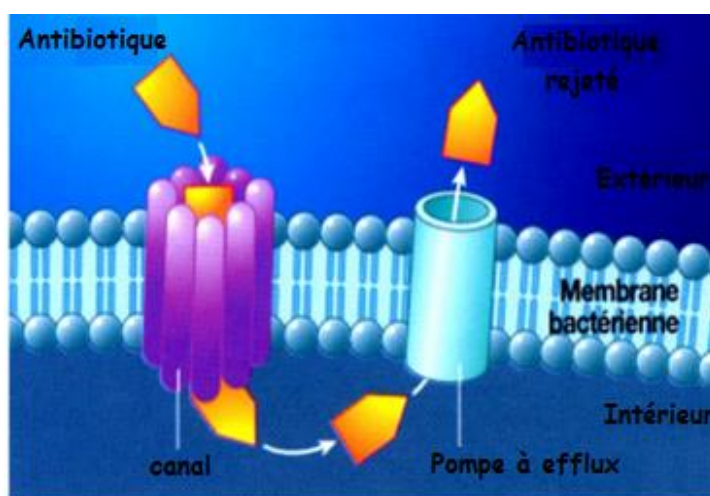


Figure I.14. Efflux actifs à travers les pompes des antibiotiques Bêta-Lactamines ⁶⁰.

d. Perméabilité réduite

Contrairement aux bactéries Gram positives, dont la structure enveloppante est assez simple et composée d'une paroi externe épaisse de peptidoglycane que les antibiotiques traversent par simple diffusion, les bactéries Gram négatives jouissent quant à elles d'une enveloppe plus complexe et plus difficilement franchissable. Ainsi, au sein des bactéries Gram négatives, les antibiotiques hydrophiles pénètrent dans la bactérie via des protéines transmembranaires nommées porines, alors que les molécules hydrophobes diffusent simplement à travers la couche phospholipidique. La membrane externe de certaines bactéries telle que *P. aeruginosa* est moins perméable que celle d'autres espèces, ce qui lui confère un niveau moins élevé de sensibilité aux antimicrobiens. En outre, des mutations au niveau des gènes qui codent pour la synthèse des porines et qui conduisent à leur perte, ou à la réduction de leur taille ou encore à une diminution de leur expression, se traduiront par l'acquisition de bas niveaux de résistance

vis-à-vis de nombreux antibiotiques. La diminution de la perméabilité est donc un mécanisme de résistance cliniquement très important chez les bactéries Gram négatives et plus précisément chez *P. aeruginosa* et les Enterobacteriaceae, étant donné le large spectre d'antibiotiques qu'elle cible ⁵⁸ (Figure I.15).

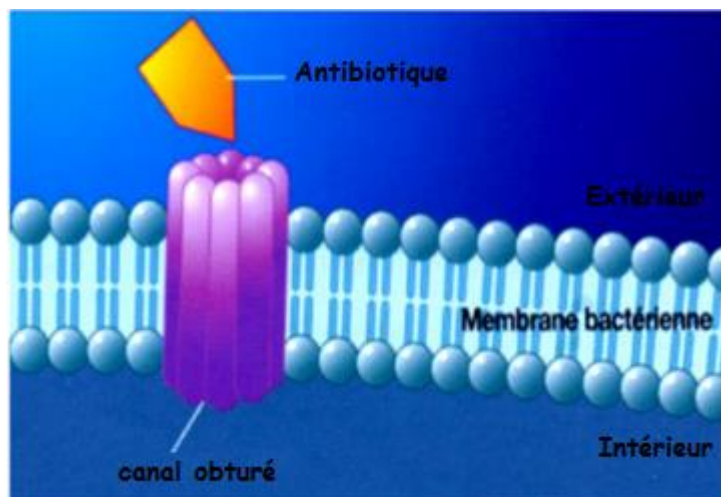


Figure I.15. Altération de la production des porines membranaires ⁶⁰.

1.5.3. Mécanisme de résistance par production de bêta-lactamases (BLs)

1.5.3.1. Historique

Le premier mécanisme de résistance aux bêta-lactamines était la production de pénicillinases (identifiées plus tard comme étant des serine-bêta-lactamases) à spectre étroit après la commercialisation de la pénicilline au début des années **40**. Devant l'apparition de ces enzymes, des céphalosporines à spectre élargi de troisième génération (**C3G**) ont été développées dans les années **70-80**. Cependant, leur utilisation par la suite en thérapie hospitalière intensive a favorisé l'apparition précoce de nouvelles enzymes capables de les hydrolyser ⁶².

Ces enzymes, du fait de l'élargissement de leur activité, sont appelées bêta-lactamases à spectre étendu (**BLSE**), dont la première BLSE décrite en **1983** en Allemagne était isolée en milieu hospitalier ⁶³. Ces BLSE principalement produites par les *Klebsiella spp* et les *Enterobacter spp* étaient associées à de nombreuses épidémies hospitalières notamment en réanimation ⁶⁴. Les BLSE les plus fréquentes étaient de type TEM ou SHV. En **1989**, un nouveau type de BLSE capable d'hydrolyser le céfotaxime a été isolé chez un enfant de 4 mois à Munich d'où sa désignation **CTX-M** (CTX pour céfotaxime et M pour Munich).

L'émergence des CTX-M a apporté des changements majeurs dans l'épidémiologie des BLSE. En effet, à l'inverse des BLSE classiques de type TEM ou SHV issues de mutations génétiques de pénicillinases, les BLSE de type CTX-M dérivent des gènes chromosomiques naturellement présents chez les bactéries du genre *Kluyvera* provenant de l'environnement et ont été transférés par l'intermédiaire d'un plasmide à une souche adaptée à l'homme, *E.coli* ⁶⁵. Les BLSE initialement produites par des espèces responsables d'épidémies hospitalières, sont aujourd'hui majoritairement produites par les *E.coli*, principale espèce d'entérobactérie présente dans la flore intestinale de l'homme ⁶⁶. Dès les années 2000, le CTX-M est devenu le type dominant chez les entérobactéries BLSE et est en pleine expansion dans plusieurs pays dans le monde ^{64, 66}.

Les plasmides, éléments génétiques mobiles, ont joué un rôle central dans la dissémination des souches productrices de BLSE qui sont désormais aussi bien retrouvées en milieu hospitalier qu'en milieu communautaire. Les BLSE restent principalement produites par les entérobactéries mais peuvent également être produites par des bactéries non fermentaires telles que les *Pseudomonas spp.* et *Acinetobacter spp.* ⁶⁷. En effet, les plasmides permettent le transfert du gène de résistance BLSE entre les espèces d'entérobactéries et à d'autres familles de bactéries.

I.5.3.2. Généralités sur les bêta-lactamases

Les bêta-lactamases sont des hydrolases, appartenant à la famille d'enzymes EC 3.5.2.6 plus précisément des amidases bactériennes qui catalysent l'hydrolyse de la liaison amide du cycle bêta-lactame des antibiotiques bêta-lactamines pour générer des produits inefficaces sur les bactéries ⁶⁸. Leur biosynthèse est codées par des gènes chromosomiques et par des gènes plasmidiques donc transmissibles d'une bactérie à une autre et une fois biosynthétisées, elles sont secrétées dans l'espace extracellulaire chez les bactéries Gram-positif et dans l'espace périplasmique chez les bactéries Gram-négatif (Figure I.16). Chez certaines espèces bactériennes, l'exposition à un antibiotique bêta-lactame peut provoquer l'induction de leur production, entraînant des concentrations élevées de ces bêta-lactamases, ce qui conduit à une résistance clinique ⁶⁹.

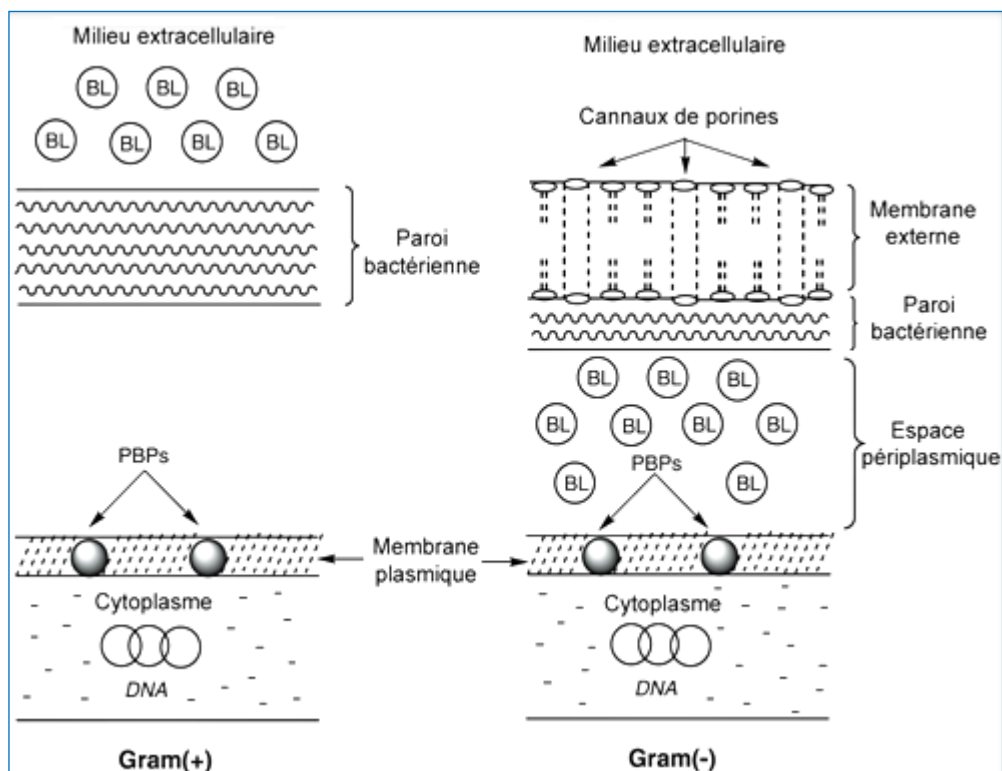


Figure I.16. Espaces de secretion des bêta-lactamases chez les bactéries à Gram positif et à Gram négatif ⁷⁰.

I.5.3.3. Classification des bêta-lactamases

Les bêta-lactamases (BLs) sont classées en générale selon leur structure primaire, leur spectre hydrolytique (profil substrats), leur sensibilité aux inhibiteurs et si elles sont codées par des chromosomes ou par des plasmides ⁷¹.

La première classification proposée est celle d'Ambler (1980) qui utilise le critère de la structure primaire et comporte quatre classes : A, B, C et D (tableau I.3). Les bêta-lactamases de classe A, C et D sont toutes des sérines-bêta-lactamases (SBLs) dans lesquelles l'acide aminé sérine du site actif joue un rôle pivot dans l'hydrolyse de leurs substrats. À l'opposé, les bêta-lactamases de la classe B ont besoin d'un ou deux atomes de zinc ionisé (Zn^{2+}), un métal, pour réaliser cette hydrolyse d'où le nom de métallo-bêta-lactamases (MBLs) ⁵⁴.

Une deuxième classification des bêta-lactamases a été proposée par la suite, c'est celle de Bush-Jacoby-Medeiros (1989). Elle prend en considération la diversité fonctionnelle des bêta-lactamases au sein des quatre classes structurales d'Ambler. Elle repose sur la sensibilité des enzymes aux inhibiteurs (acide clavulanique, EDTA) d'une part et sur le profil de leurs substrats préférentiels, d'autre part. Cette classification sépare également les métallo-

bêta-lactamases des serine-bêta-lactamases ; le premier type constitue un seul groupe appelé groupe 3 ; le second type est y divisé en trois groupes 1, 2 et 4 ⁷² (Tableau I.4).

Tableau I.4. Classifications structurales et fonctionnelle des bêta-lactamases selon Ambler (1980) et selon Bush-Jacoby-Meideros (1989) ⁷³.

Classification		Enzymes représentatives
Structurale d'Ambler	Fonctionnelle de Bush	
Sérine-bêta-lactamases		
Classe A	2a	Pénicillines à spectre restreint (PC1)
	2b	Pénicillines à spectre large (TEM-1, TEM-2, SHV-1)
	2be	Pénicillines à spectre étendu (BLSE, TEM, SHV, CTX-M)
	2br	TEM résistante aux inhibiteurs (TRI)
	2c	Carbénicélinases (PEE-1)
	2*	Céfuroximes (FEC-1)
	2f	Carbapénémases (KPC-1, SME-1)
	4	Penicillinase de <i>Pseudomonas cepacia</i>
Classe C	1	Céphalosporinases (AmpC, CMY-2, MIR-1)
Classe D	2d	Oxacillines (OXA-1)
Métallo-bêta-lactamases		
Classe B	3	Carbapénémases (L-1, IMP-1, VIM-1, NDM-1)

1.5.4. Mécanisme de résistance bactérienne par production de métallo-bêta-lactamases (MBLs).

1.5.4.1. Historique

En 1966, Sabath et Abraham ont mis en évidence une activité céphalosporinase dans des préparations brutes de pénicillines, 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 ⁷⁴. 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 bêta-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 ^{75, 76}. 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 carbapénèmase et l'insensibilité aux inhibiteurs classiques de bêta-lactamases à serine (acide clavulanique, acide penicillanique sulfones). En **1982**, Saino et ses collaborateurs misent en évidence dans des souches de *Stenotrophomonas maltophilia* (bacille à Gram négatif n'appartenant pas aux entérobactéries) une activité pénicillinase prépondérante et dégradante de l'imipénème. Cette activité revient, en fait, à une enzyme chromosomique inductible et n'est active qu'en présence du zinc. Pour ces chercheurs il s'agit d'une métallo-enzyme qu'ils ont désignée bêta-lactamase 1 (L1) ⁷⁷.

L'existence de cette activité imipénèmase 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 Japon ^{78, 79} en 1988 était résistante à l'imipénème par suite de la synthèse d'une métallo-enzyme désignée IMP-1, une enzyme plasmidique transférable ⁸⁰ qui conférait la résistance à toutes les bêta-lactamines sauf l'aztréonam ⁸¹. 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 Métallo-bêta-lactamase (NDM) et la Florence Imipénèmase (FIM-1) (en **2012**) ⁸² ont été identifiées dans les entérobactéries et leurs gènes très mobiles sont à l'origine de bouffées épidémiques.

I.5.4.2. Définition

Les métallo-bêta-lactamases (MBLs) appelées également bêta-lactamases de classe B, bêta-lactamases de groupe 3 ou Zn-bêta-lactamases, sont des enzymes qui requièrent un ou deux ions zinc pour hydrolyser le cycle bêta-lactame des bêta-lactamines. Elles ne présentent aucune homologie structurale avec les SBLs mais possèdent par contre un profil substrats large. A l'exception des monobactames, elles hydrolysent une vaste gamme d'antibiotiques bêta-lactamines incluant les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes et les céphamycines, constituant ainsi une menace clinique énorme pour l'antibiothérapie ⁸³.

I.5.4.3. Classification

Dans la classification d'Amblar (1980), les MBLs sont subdivisées en trois sous-classes : B1, B2 et B3 selon deux critères, l'homologie des structures primaires relatives et les caractéristiques distinguant leurs sites actifs ⁶⁸. Le pourcentage d'homologie est inférieur à 20% entre les sous-classes, mais plus élevé dans la même sous-classe. Pour le deuxième critère, il s'agit des différences dans les résidus d'acides aminés fixant ou coordonnant le Zn ⁸⁴.

Sous-classe B1 : Les enzymes de la sous-classe B1 partagent plus de 23% d'homologie de structure primaire ⁸⁵. Le mécanisme catalytique de ces enzymes nécessitent deux ions zinc, le premier (Zn1) est coordonné avec trois résidus His (souvent His116, His118 ; His196) et le second (Zn2) est coordonné avec trois résidus d'acides aminés différents, un résidu Asp, un résidu Cys et un résidu His (souvent Asp120, Cys221, His263). Cette sous classe contient le plus grand nombre de membres cliniquement pertinents, y compris les VIM (MBL codée par l'intégrine de Véroine), les IMP (imipénémases) et les NDM (New Delhi MBL) ⁸⁴.

Sous-classe B2 : Les membres de la sous-classe B2 ne présentent que 11% d'homologie de structure primaire avec les membres de la sous-classe B1. Elles sont des carbapénémases strictes. Ils hydrolysent seulement les carbapénèmes de manière efficace. Dans cette sous-classe l'His116 conservée des enzymes B1 et B3 est remplacée par une asparagine. La présence de cette asparagine en position 116 est loin d'être la seule raison qui explique le spectre étroit des métallobêta-lactamases B2. Elle inclut surtout les enzymes produites par diverses espèces d'*Aeromonas* (ACSP, SIG, ACSP2, CphA) ⁸⁵.

Sous-classe B3 : Les MBLs de la sous-classe B3 n'ont que neuf résidus conservés par rapport aux autres MBLs ⁸⁶. Le résidu His116 coordonnant le Zn1 peut être remplacé par un résidu Gln116. Les enzymes de cette sous-classe comprennent les MBLs L1, GOB-1, FEZ-1 et SMB-1. A l'exception de L1 qui est un homo-tétramère, toutes ces enzymes sont monomériques comme le sont les enzymes des sous classes B1 et B2 ⁸⁵.

En 1989 Bush avait classé les MBLs en fonction de leurs propriétés fonctionnelles à savoir le profil substrat et leurs sensibilités aux inhibiteurs. Cette classification a été révisée par le même auteur entre 1995 et 1997 pour accueillir le nombre croissant des enzymes du groupe 3. Celui-ci a été subdivisé en trois sous-groupes : groupe 3a, groupe 3b et le groupe 3c sur la base de leurs capacités à hydrolyser les imipénèmes et autres bêta-lactamines.

Sous-groupe 3a : Les MBLs de ce groupe appelé également groupe Ba sont d'une structure quaternaire monomérique. Elles ont un large spectre d'activité car elles hydrolysent efficacement les pénicillines et les céphalosporines. Elles incluent à titre d'exemple la bêta-Lactamase II, la CcrA et l'IMP-1 ⁸⁷ (Tableau I.5).

Sous-groupe 3b : La structure quaternaire des MBLs de ce groupe appelé aussi groupe Bb est monomérique. Elles hydrolysent spécifiquement les Carbapénèmes. Elles incluent à titre d'exemple l'ImiS et la CphA ⁸⁷ (Tableau I.5).

Sous-groupe 3c : Appelé également groupe Bc, ses MBLs ont une structure quaternaire tétramérique contrairement à celles des deux premiers sous-groupes. Elles hydrolysent les pénicillines, les céphamycines et spécifiquement les céphalosporines d'où leur nom de céphalosporinases. Elles incluent à titre d'exemple la L1 ⁸⁷ (Tableau I.5).

Tableau I.5. Classification de Bush des MBLs membres du groupe 3 ⁸⁷.

Sous-groupe	Substrat	Structure quaternaire	Exemples
3a	Pénicillines	Monomère	Bc II, CcrA, IMP-1
	Céphalosporines		
3b	Carbapénèmes	Monomère	ImiS, CphA
3c	Pénicillines	Tétramère	L1
	Céphalosporines		
	Céphamycines		

I.5.4.4. Structures

Structure moléculaire

Les métallo-bêta-lactamases monomériques sont constituées en moyenne de 230 résidus d'acides aminés. Leurs poids moléculaires varient entre 25 et 118 kDa, leurs points isoélectriques varient entre 2.5 et 10.5 ⁸⁸. La L1 est la seule métallo-bêta-lactamase tétramérique. La masse moléculaire de chaque monomère est de 28.8 kDa d'où une masse moléculaire de 115 kDa. Son point isoélectrique est de l'ordre de 6 ⁸⁹.

Les structures secondaires de toutes les MBLs y compris la seule MBL tétramérique (L1) comprennent cinq structures α (5 hélices), douze structures β (12 feuilletts) et une seule boucle. Malgré une faible similarité de séquences entre les diverses métallo-bêta-lactamases, la structure tertiaire générale de ces enzymes est très similaire ⁹⁰. Il s'agit d'une structure en

sandwich ($\alpha\beta\beta\alpha$) avec des feuillets β anti-parallèles au centre, flanqués par des hélices- α . Le site actif se trouve enchâssé au centre de cette structure ⁸⁵ (Figure I.117).

La structure quaternaire est monomérique sauf dans le cas de la MBL L1 qui est homotétramérique. La tétramérisation est le résultat d'interactions principalement de nature hydrophobe permettant à chaque sous-unité ou monomère de se lier à chacune des trois autres ⁹¹ (Figure I.18).

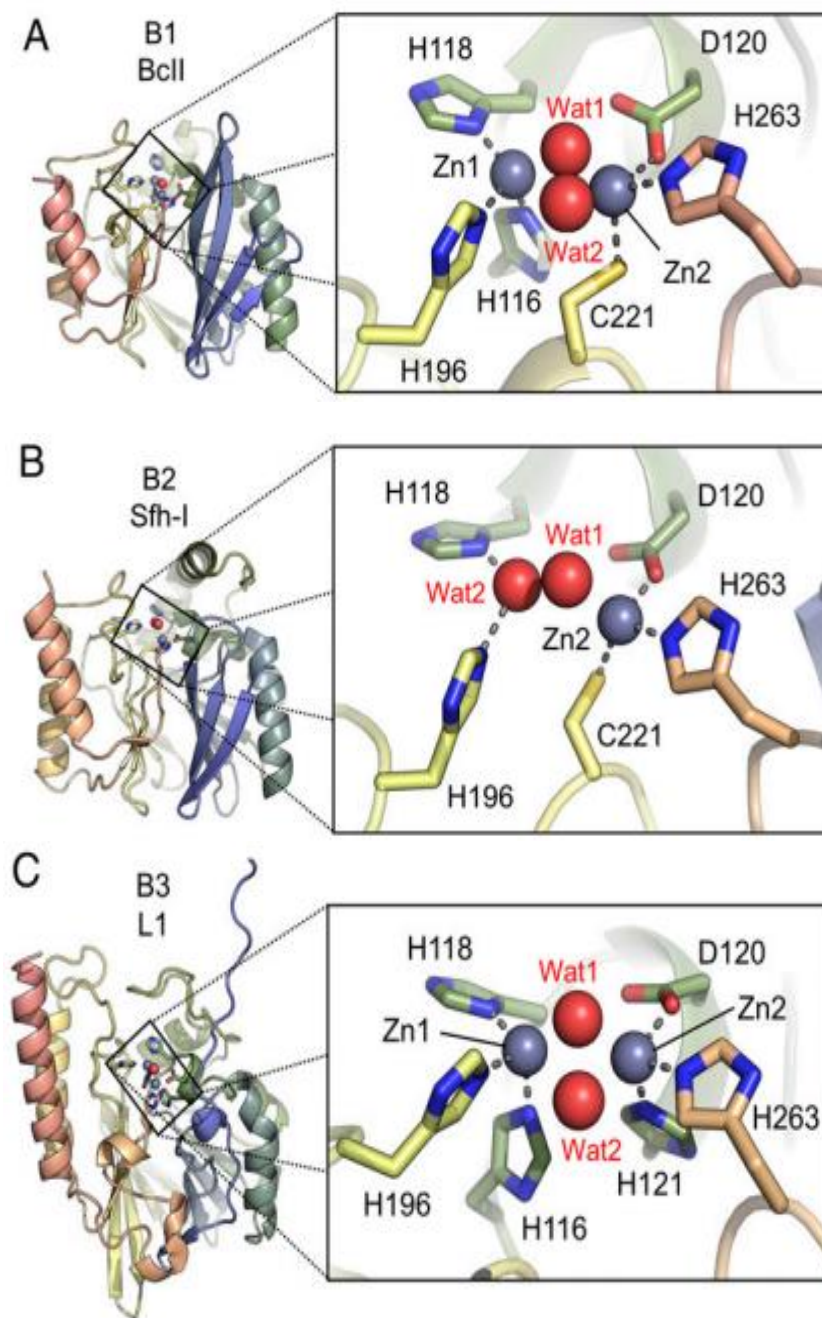


Figure I.17. Architecture des métallo-bêta-lactamases B1, B2 et B3. Le pli $\alpha\beta\alpha$ commun des MBLs représentatifs est coloré du N (bleu clair) vers l'extrémité C (rouge clair) et est représenté à côté d'une vue rapprochée du site actif (encadré). Les ions zinc (gris) et les molécules d'eau (rouge) sont représentés comme des sphères. Les liaisons de coordination du zinc sont représentées par des tirets gris, les résidus correspondants (étiquetés) étant représentés par des bâtonnets (A) B1 BcII, (B) B2 Sfh-I, et (C) B3 L1 ⁹².

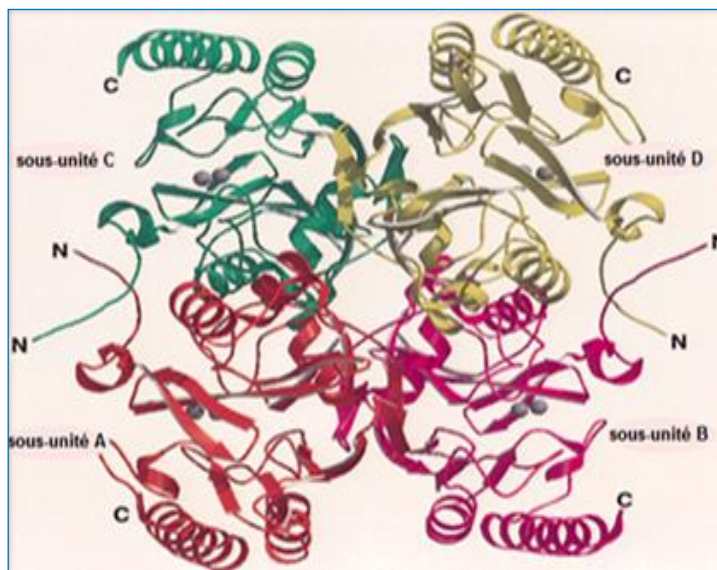


Figure I.18. Structure du tétramère *Stenotrophomonas maltophilia* L1 reconstituée à l'aide de rubans. Les ions zinc sont représentés par des sphères grises. Les sous-unités individuelles sont identifiées par des couleurs ⁹¹.

Structure du site actif

Le site actif des MBLs est situé au fond d'une large rainure peu profonde entre deux feuillets β et possède deux sites potentiels de liaison aux ions zinc, souvent appelés site 1 et site 2. Les résidus d'acides aminés ligands de zinc dans les deux sites ne sont pas identiques et ne sont pas entièrement conservés entre les différentes MBLs. Le tableau I.6 montre les résidus d'enzyme impliqués dans la coordination du zinc dans les deux sites de liaison dans les sous-classes B1, B2 et B3 ⁸³.

Cas des MBLs B1 : Dans cette sous-classe, le site actif peut être mononucléaire, autrement dit les acides aminés établissent des liaisons avec un seul ion de zinc. Ces acides aminés sont trois histidines : His116, His118 et His196 (Voir Figure I.13). Le site actif B1 peut être également binucléaire possédant en d'autre terme deux sites de fixation de Zn appelés site 1 et site 2 liant chacun un Zn. Au niveau du site 1, l'ion Zinc est lié à trois résidus histidine (His116, His118 et His196) ; au niveau du site 2, l'ion Zinc est coordonné avec trois résidus différents, souvent Asp 120, Cys221 et His263 (Figure I.19) ⁸⁸.

Cas des MBLs B2 : Dans cette sous-classe, le site actif est toujours du type mononucléaire. Les acides aminés qui établissent des liaisons avec le seul ion zinc sont Asn 116 au lieu d'un His, Cys221 et His263 (Figure I.19) ⁸⁸.

Cas des MBLs B3 : Chez cette sous-classe, le site actif peut être mononucléaire, les acides aminés établissant des liaisons avec le seul ion zinc sont au nombre de trois et sont tous des résidus histidines (His116, His118 et His196). Il peut être également binucléaire. Dans le site 1, l'ion métallique est coordonné avec les mêmes résidus rapportés dans le cas des enzymes de la sous-classe B1, à savoir His116, His118 et His196 ⁹³. Quant au site 2, celui-ci est légèrement différent en ce qui concerne les acides aminés liant l'ion Zn par comparaison au site 2 des MBLs B1. Ces aminoacides sont Asp120, His121 au lieu d'un Cys et His263 ⁸⁸ (Figure I.19).

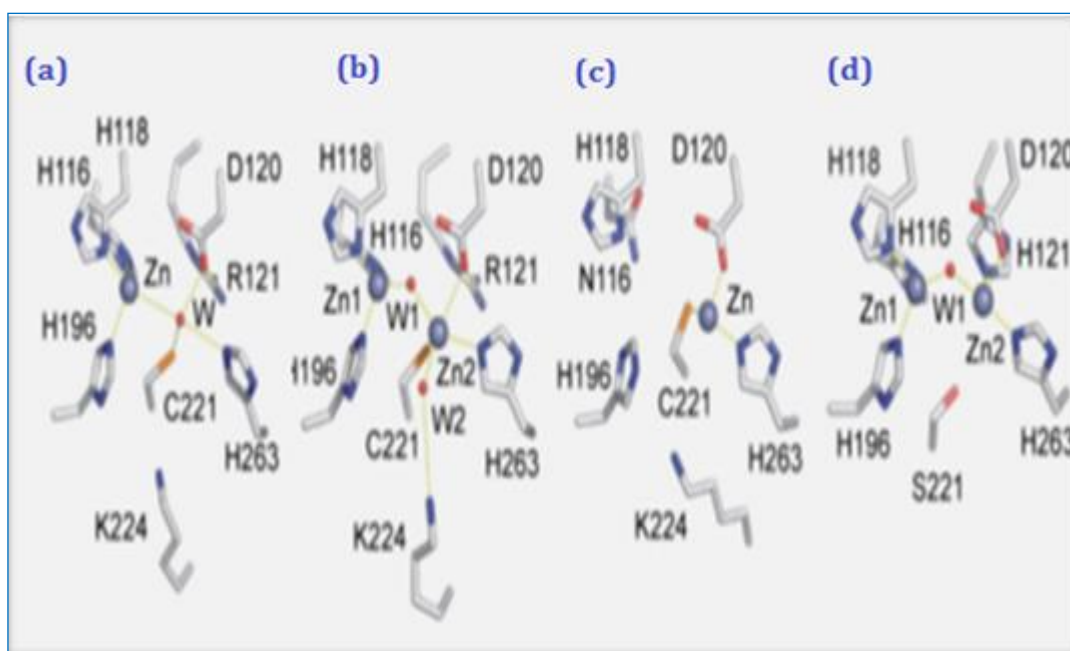


Figure I.19. Structures de sites de liaison métallique de membres représentatifs des MBLs. (a) Mono-Zn (II) BcII provenant de *B. cereus* (B1) ; (b) Di-Zn (II) BcII de *B. cereus* (B1) ; (c) Mono-Zn (II) CphA provenant de *A. hydrophila* (B2) ; (d) L1 provenant de *S. maltophilia* (B3) ⁸⁸.

Tableau I.6. Résidus d'acides aminés des sites actifs des trois sous-classes MBLs coordonnés avec les ions du zinc ⁹¹.

bêta-lactamases	Les ligands Zn1			Les ligands Zn2		
Sous classe B1						
Consensus BBL*	His116	His118	His196	Asp120	Cys221	His263
Bc II	His86	His88	His149	Asp90	Cys168	His210
IMP-1	His77	His79	His139	Asp81	Cys158	His197
CcrA	His99	His101	His162	Asp103	Cys181	His223
VIM-1	<u>His88</u>	<u>His90</u>	<u>His153</u>	<u>Asp92</u>	<u>Cys172</u>	<u>His214</u>
BlaB	<u>His 76</u>	<u>His78</u>	<u>His139</u>	<u>Asp80</u>	<u>Cys158</u>	<u>His200</u>
IND-1	<u>His96</u>	<u>His98</u>	<u>His159</u>	<u>Asp100</u>	<u>Cys178</u>	<u>His220</u>
Sous classe B2						
Consensus BBL	Asn 116	His118	His196	Asp120	Cys221	His263
CphA	<u>Asn69</u>	<u>His71</u>	<u>His148</u>	<u>Asp73</u>	<u>Cys167</u>	<u>His205</u>
Sfh-1	<u>Asn72</u>	<u>His74</u>	<u>His151</u>	<u>Asp 76</u>	<u>Cys170</u>	<u>His212</u>
Sous classe B3						
Consensus BBL	His/Gln116	His118	His196	Asp 120	His121	His263
L1	His84	His86	His160	Asp88	Cys89	His225
FEZ-1	<u>His71</u>	<u>His73</u>	<u>His149</u>	<u>Asp75</u>	<u>Cys76</u>	<u>His215</u>
GOB-1	<u>Gln80</u>	<u>His82</u>	<u>His157</u>	<u>Asp84</u>	<u>Cys 85</u>	<u>His213</u>
THIN-B	<u>His105</u>	<u>His107</u>	<u>His185</u>	<u>Asp109</u>	<u>Cys110</u>	<u>His253</u>

**BBL : Bêta-Lactamase classe B.*

I.5.4.5. Mécanisme d'action

Bien que l'exigence des ions métalliques dans l'hydrolyse des antibiotiques bêta-lactamines par les MBLs soit encore un sujet de débat, plusieurs mécanismes catalytiques ont été proposés pour les MBLs de site actif mono et binucléaire. Dans ce qui suit nous nous limiterons au mécanisme catalytique d'une MBL de classe B1, la BCII, une MBL d'un site actif qui peut être mono ou bi-nucléaire. Dans le cas du site actif mononucléaire, les principales étapes du mécanisme catalytique sont :

(1) La formation du complexe de Michaëlis: le OH d'une molécule d'eau déprotoné par le résidu asparagine 120, établie une liaison avec l'ion Zn et attaque le carbone du carbonyle du cycle β -lactame. Ceci entraîne la formation d'un complexe intermédiaire tétrahédrique chargé négativement. Les quatre liaisons établies par l'ion zinc servent de stabilisateur de cet intermédiaire.

(2) La catalyse: Le résidu Asp120 cède un proton à l'azote du cycle β -lactame entraînant le clivage de la liaison amide C-N de ce cycle et son ouverture.

(3) 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'enzyme⁹⁴ (Figure I.20).

Dans le cas du site actif bi-nucléaire, les principales étapes du mécanisme catalytique sont toujours les mêmes :

(1) La formation du complexe de Michaelis : l'ion hydroxyle provenant d'une première molécule d'eau de pontage Zn1-Zn2 est responsable de l'attaque nucléophile du carbone du carbonyle du cycle bêta-lactame, qui aboutit à un intermédiaire chargé négativement.

(2) La catalyse : La deuxième molécule d'eau apicale liée au zinc est positionnée de manière optimale à donner un proton à l'azote entraînant le clivage de la liaison C-N de cycle bêta-lactame et son ouverture.

(3) Libération du produit: le clivage de liaison C-N du cycle bêta-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 hydroxyle 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^{93,94} (Figure I.21).

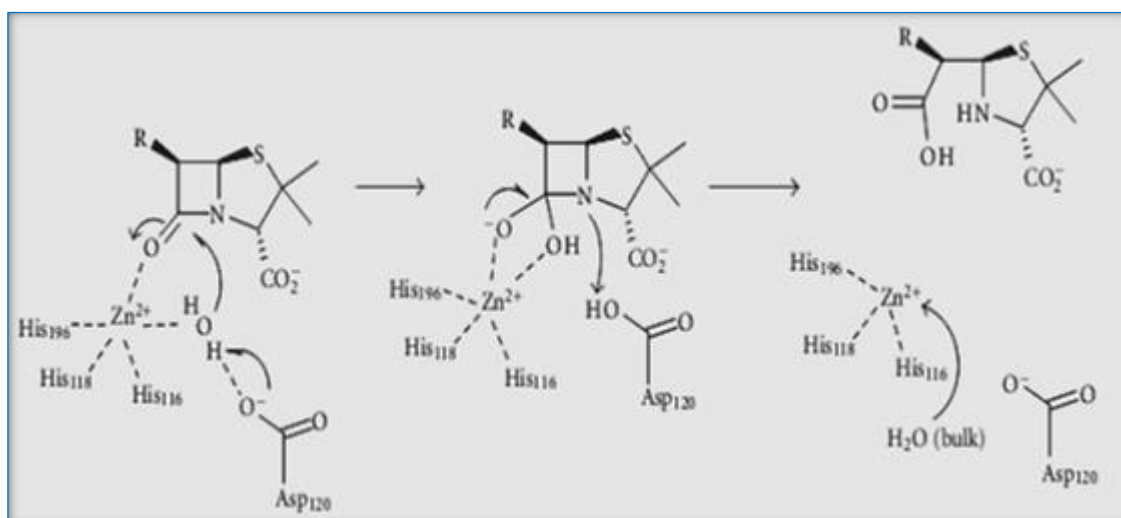


Figure I.20. Mécanisme d'hydrolyse des bêta-lactamines par une MBL de la sous-classe B1 (BCII mononucléaire) proposé par Karsisiotis et ses collaborateurs (2014). (1) : mécanisme de formation du complexe de Michaelis, (2) : mécanisme de clivage de la liaison C-N du cycle bêta-lactames (ouverture du cycle), (3) : dissociation du complexe produit-enzyme⁹³.

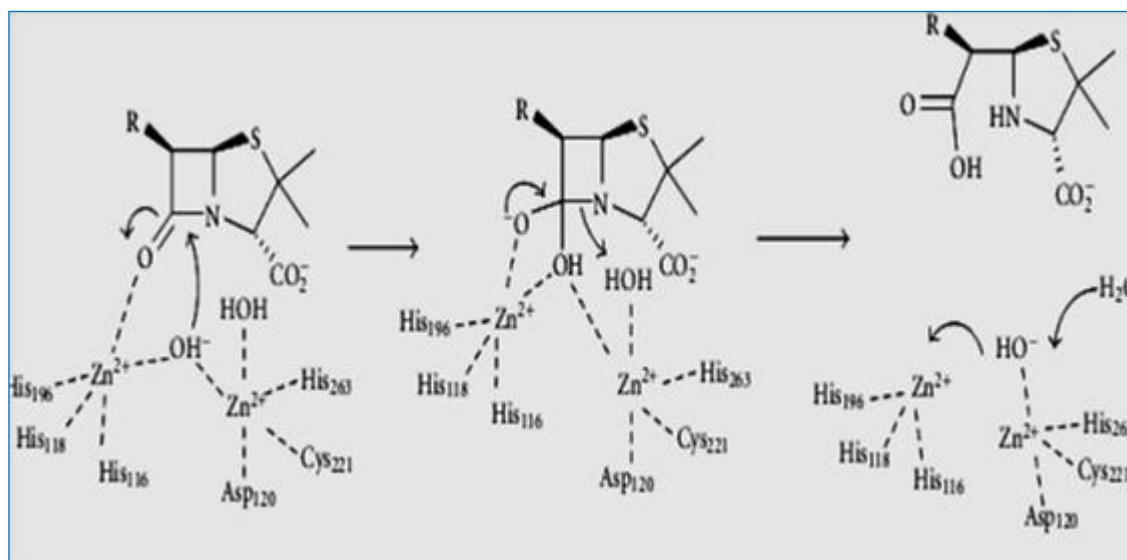


Figure I.21. Mécanisme d'hydrolyse des bêta-lactamines par une MBL de la sous-classe B1 (BCII bi-nucléaire) proposé par Karsisiotis et ses collaborateurs (2014). (1) : mécanisme de formation du complexe de Michaelis, (2) : mécanisme de clivage de la liaison C-N du cycle β -lactames (ouverture du cycle), (3) : dissociation du complexe produit-enzyme ⁹³.

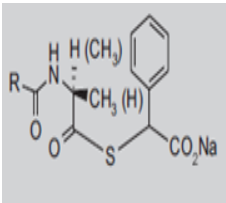
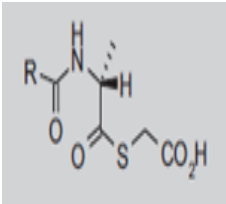
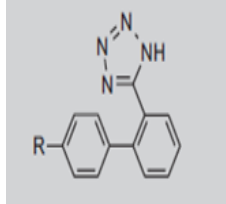
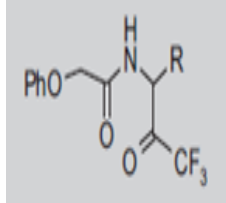
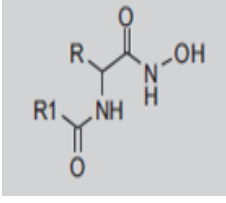
I.5.4.6. Inhibiteurs

Tous les inhibiteurs connus des SBLs appelés parfois inactivateurs (acide clavulanique, tazobactam, sulbactam...) sont inefficaces vis-à-vis des MBLs. Les inhibiteurs de ces dernières mis en évidence jusqu'à présent sont tous des chélateurs de métaux (EDTA, 10-phénanthroline, dipicolinic acid...) et n'ont aucun intérêt clinique. Plus récemment, des revues bibliographiques ont rapporté les inhibiteurs expérimentaux mis en évidence jusqu'à présent qui sont entre autres des dérivés thioesters, des alcools et des cétones trifluorométhylés, des sulfonylhydrazones, des produits naturels tricycliques, des dérivés d'acide succinique, des biphényltétrazoles, des cystéinylpeptides, des carbapénèmes, des dérivés de pénicilline parmi lesquels un intéressant inhibiteur thio-substitué de la pénicilline, des produits de dégradation des céphalosporines, des composés thiols tels que l'acide mercaptoacétique et les thioesters, l'acide thiomandélique, le captopril, les dérivés de l'acide benzohydroxamique et les carboxylates de pyridine ⁸⁵ (Tableau I.7).

La propagation des MBLs parmi les souches bactériennes nosocomiales justifie la recherche de composés pouvant contrarier l'activité de ces enzymes. Malheureusement, la découverte d'un inhibiteur spécifique cliniquement utile des MBLs est rendue difficile par le fait que ce composé doit rester inactif vis-à-vis des protéines humaines qui sont membre de la superfamille de métallo-enzymes telles que l'enzyme de conversion de l'angiotensine, le

cytochrome P450. Une autre difficulté est de trouver un composé actif sur l'ensemble des trois sous-classes de métallo-bêta-lactamases et même sur toutes les enzymes au sein d'une même sous-classe. Actuellement, les inhibiteurs connus inhibent efficacement une ou deux métallo-bêta-lactamases et sont beaucoup moins actifs sur les autres. De plus, ils restent peu pratiques à utiliser comme agents thérapeutiques.

Tableau I.7. Exemples d'inhibiteurs des métallo-bêta-lactamases ⁹⁵.

Classes chimiques d'inhibiteur	Exemple	IC ₅₀ (μM)				Caractère d'inhibition
		L-1	CfhA	IMP-1	BcII	
Thioester d'acide mercapto-phénylacétique		< 1.9 - 8	> 58-1000	ND	22-479	Compétitif
Thioester d'acide mercapto-acétique		3-8	>1000	ND	38-645	Irréversible
biphényl tétrazoles		ND	0.3-860	ND	ND	Compétitif
trifluorométhylalcoole /cétone		1.5->5000	ND	60-300	30-700	Compétitif
Hydroxamate		pas d'activité	pas d'activité	pas d'activité	pas d'activité	Inhibition progressive d' <i>Aeromonas hydrophila</i> AE036

ND : Non Déterminé.

I.5.5. Epidémiologie

I.5.5.1. Au niveau mondial

L'intérêt accru pour les métallo-bêta-lactamases ne s'accompagne pas de données épidémiologiques robustes, étant donné que l'identification moléculaire des métallo-bêta-lactamases n'a pas souvent été effectuée dans le cadre d'études à grande échelle ⁹⁶.

Les MBLs de la sous-classe B1 en particulier le type VIM et IMP sont les plus répandues dans le monde (Figure I.22). Leur hôte la plus habituelle est *K.pneumoniae* avec des niveaux d'expression de la résistance aux carbapénèmes variables. Plusieurs épidémies de souches d'entérobactéries productrices de MBLs ont été identifiées, notamment au Japon, en Italie, en Espagne et en Grèce. Les milieux biologiques d'isolats cliniques de ces souches sont variables : urines, sang et sécrétions bronchiques majoritairement. L'Europe du Sud contribue fortement à la diffusion de ces marqueurs de résistance (VIM-1 notamment). En Grèce, la proportion de souches de *K. pneumoniae* résistantes aux carbapénèmes a augmenté considérablement passant de moins de 1 % en 2001 à 20 % dans les unités classiques d'hospitalisation et à 50 % dans les unités de soins intensifs en 2006. Des souches VIM ont été trouvées dans 3 hôpitaux en 2002 puis dans 40 hôpitaux en 2006 dans le même pays. L'identification de VIM-1 chez *P.mirabilis*, toujours dans ce pays, indique une transmission communautaire de ce déterminant de résistance. Par ailleurs, NDM-1 est l'une des métallo-bêta-lactamases la plus récemment décrite. Elle aurait déjà une diffusion internationale importante, identifiée au moins en Inde, au Pakistan et en Grande-Bretagne chez *K.pneumoniae* et *E.coli* en milieu hospitalier et également en milieu communautaire ⁹⁷. En outre, ces enzymes NDM ont été signalés dans plusieurs autres pays africains, comme l'Egypte, le Maroc, l'Algérie, le Kenya, le Cameroun et la Tanzanie ⁹⁸. Les taux de mortalité associés aux infections dues à ces entérobactéries produisant des métallo-bêta-lactamases varient de 18,8 % à 66,7 % ⁹⁷.

I.5.5.2. En Algérie

Comme dans le cas du reste du monde, en Algérie les données relatives à l'épidémiologie de la résistance bactérienne aux bêta-lactamines y compris les carbapénèmes par production de MBLs sont minimales mais montrent que celle-ci se propage de plus en plus dans ce pays. En 2010, on a rapporté la présence de carbapénémases chez différents groupes de bactéries à Gram négatif notamment *Pseudomonas spp*, *Acinetobacter spp*, Enterobacteriaceae et au niveau de différents types de services signalant la dissémination large de ces enzymes en Algérie et montrant une forte pression de sélection liée à l'usage des

carbapénèmes. Toujours en **2010**, cinq différentes souches bactériennes appartenant à la famille des Enterobacteriaceae ont été isolées chez deux patients hospitalisés dans l'unité de soins intensifs de l'Hôpital militaire central d'Alger, en Algérie. Les cinq souches, une souche de *Providencia stuartii*, deux souches d'*Escherichia coli* et deux souches de *Klebsiella pneumoniae*, étaient intermédiaires ou résistantes à tous les β -lactames, y compris les carbapénèmes. La synergie entre l'imipénème et l'EDTA a été observée pour les cinq souches⁹⁹.

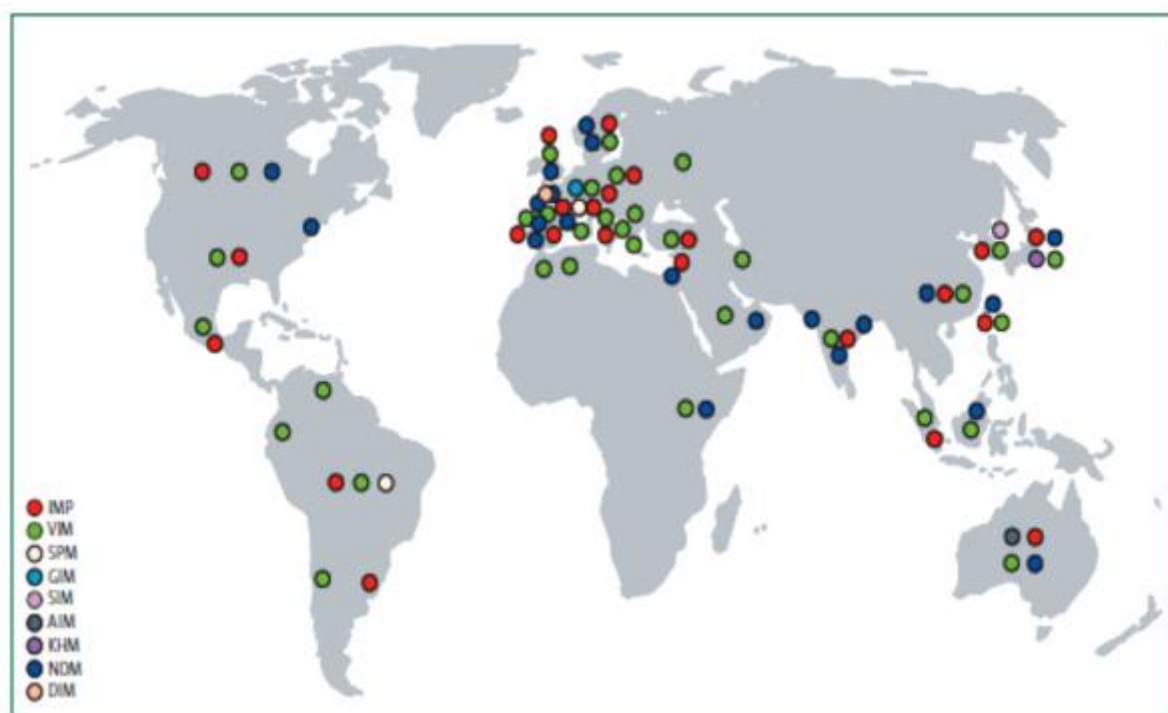


Figure I.22. Epidémiologie ou distribution mondiale des MBLs⁹⁶.

I.5.6. Infections nosocomiales

I.5.6.1. Généralités

Les infections dites « nosocomiales » (du grec nosos : maladie et komein : Prendre soin de ...) appelées aussi « infections hospitalières », ou infections associées aux soins de santé sont définies par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme des infections acquises pendant un séjour à l'hôpital et qui n'étaient ni présentes ni en incubation au moment de l'admission du patient. Lorsque la situation précise à l'admission n'est pas connue, un délai d'au moins 48 heures après admission (ou un délai supérieur à la période d'incubation lorsque celle-ci est connue) est communément accepté pour distinguer une infection d'acquisition nosocomiale d'une infection communautaire¹⁰⁰. Contrairement à l'infection nosocomiale, l'infection communautaire correspond à un type d'infection qui se propage au

sein d'une population regroupée dans un espace relativement restreint et confiné. Ces infections peuvent survenir dans des locaux, des habitations, des immeubles dotés de systèmes d'aération mal entretenus et contaminés par des germes.

Les infections nosocomiales (INs) sont causées par de nombreux microbes où chacun peut provoquer une infection dans les milieux de soins de santé. Les bactéries sont responsables d'environ 90% des INs, tandis que les protozoaires, les champignons et les virus contribuent moins que les bactériennes ¹⁰¹ (Figure I.23).

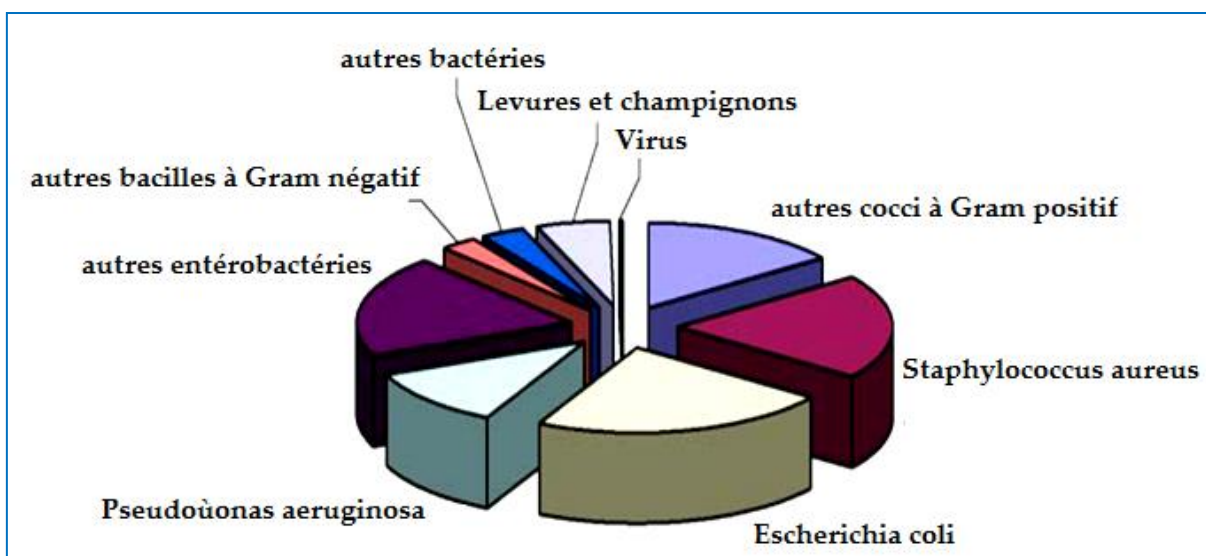


Figure I.23. Microorganismes isolés d'infections nosocomiales : enquête de prévalence nationale 2001, France ¹⁰².

I.5.6.2. Infections nosocomiales bactériennes

Les infections nosocomiales bactériennes les plus fréquentes sont l'infection urinaire nosocomiale, la pneumonie nosocomiale, l'infection des plaies opératoires et l'infection sur cathéter. Il existe d'autres infections mais moins fréquentes tel que les infections ostéo-articulaires, cardiovasculaires, de l'œil et de la sphère ORL, de la peau et des muqueuses, les toxi-infections alimentaires ¹⁰³...

Les bactéries sont les pathogènes les plus communs responsables des infections nosocomiales. Certaines appartiennent à la flore naturelle du patient et provoquent une infection seulement lorsque le système immunitaire du patient devient vulnérable aux infections. Il s'agit :

- Du genre *Acinetobacter* : c'est le genre de bactéries pathogènes responsables d'infections survenant en soins intensifs. Il est intégré dans le sol et l'eau et représente 80%

des infections signalées. La résistance aux bêta-lactamines chez *Acinetobacter* peut être enzymatique par production des bêta-lactamases chromosomiques ou plasmidiques comme elle peut être non enzymatique par modifications des PLPs qui entraînent une diminution de leur affinité pour l'imipenème ¹⁰⁴.

- La bactérie *Acinetobacter Baumannii* : c'est une bactérie fréquemment résistante à de nombreux antibiotiques, responsable d'épidémies d'infections nosocomiales le plus souvent dans des services accueillant des patients fragilisés. Elle peut persister longtemps dans l'environnement hospitalier et sa transmission est manuportée. La bactérie n'est pas toujours responsable d'infections et peut simplement être présente sur la peau ou les muqueuses des patients ¹⁰⁵.

- La bactérie *Bacteroides fragilis* : c'est une bactérie commensale (appartenant à la flore intestinale et vie des déchets qui se trouvent à l'extérieur de nos tissus) trouvée dans le tractus intestinal et le côlon. Elle provoque des infections lorsqu'elle co-existe avec d'autres bactéries. Ces bactéries présentent généralement une résistance enzymatique aux β -lactamines par production des bêta-lactamases chromosomiques, ainsi qu'une résistance non enzymatique par une diminution d'affinité des PLPs ¹⁰⁴.

- La bactérie *Clostridium difficile* : elle provoque une inflammation du côlon conduisant à une diarrhée et une colite associées aux antibiotiques, principalement en raison de l'élimination des bactéries bénéfiques avec celle des bactéries pathogènes. Ce germe est transmis de patient infecté à d'autres par le personnel de l'établissement sanitaire via de mains impropres contaminées. Ces bactéries présentent généralement une résistance enzymatique aux bêta-lactamines par production des bêta-lactamases, ainsi qu'une résistance non enzymatique par une diminution d'affinité des PLPs ¹⁰⁴.

- Les espèces du genre *Klebsiella* et *Escherichia coli* (des entérobactéries) : elles provoquent des infections en cas de migration vers d'autres parties du corps à partir de l'intestin où elles sont habituellement trouvées. Ces bactéries ont une forte résistance aux bêta-lactamine par production de BLs ¹⁰⁴.

- *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (MRSA) : il est transmis par contact direct avec les plaies ouvertes et mains contaminées. Il provoque une septicémie et une pneumonie. Il est très résistant aux antibiotiques bêta-lactamines par production des BLs essentiellement les pénicillinases ¹⁰⁴.

I.5.6.3. Epidémiologie

a. Au niveau mondial

Depuis les années **1970**, les infections nosocomiales ont été associées à 80 000 décès par an et sont classées comme la 11^{ème} cause la plus fréquente de décès hospitaliers aux États-Unis ¹⁰⁶.

En 2009, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estimait que 1.4 millions de personnes étaient malades dans le monde de suite d'infections contractées en milieu hospitalier. Dans les pays développés, ces infections touchent 5 à 10 % des patients. La prévalence des infections nosocomiales (INs) est de 4.5 % aux USA, 10.5 % au Canada, 6.7 % en France et 6.2 % en Belgique ¹⁰⁰. En **2010**, une étude multicentrique dans la région méditerranéenne a été réalisée dans 27 hôpitaux en Algérie, en Égypte, en Italie, au Maroc et en Tunisie afin d'évaluer la prévalence et les caractéristiques des infections nosocomiales sur 4634 malades. La prévalence des INs était de l'ordre de 10.5 % et plus élevée au niveau des centres non universitaires et dans les hôpitaux de taille moyenne. Quant aux caractéristiques, globalement, les infections urinaires étaient les plus fréquentes. Les services de pédiatrie étaient les plus touchés (11.3 %). Les germes les plus fréquemment isolés étaient *E.coli* (17.2 %), *S.aureus* (12.5 %), *P.aeruginosa* et *K.pneumoniae* (9.2 % chacun). Selon cette étude, les causes principales des INs étaient une mauvaise ventilation mécanique, un délai d'hospitalisation supérieur ou égal à 8 jours, la présence d'un cathéter central ou périphérique, une sonde urinaire, le diabète et l'âge ¹⁰⁷.

b. En Algérie

A notre connaissance les données liées à l'épidémiologie des INs dans ce pays datent des années quatre-vingt-dix et se limitent à la région algéroise. Les résultats d'études ponctuelles consacrées aux infections nosocomiales dans cette région du pays publiés en 1991, situent leur taux de prévalence entre 14 et 25 %. Trois ans après, une enquête de prévalence portant sur l'ensemble des malades hospitalisés, à l'exception de ceux ayant séjourné moins de 48 heures, a été réalisée au CHU de Bab Eloued à Alger pour apprécier encore une fois l'ampleur des infections nosocomiales. Cette enquête a montré que parmi les 426 malades hospitalisés, 69 étaient infectés, soit une prévalence de 16.2%. Les infections de plaies opératoires étaient les plus fréquentes, constituant 35.4% de l'ensemble des infections. Les infections urinaires occupaient la deuxième position (29.3%) suivies par les infections de la peau et celles survenant sur cathéter intraveineux (22.0%) et la pneumonie (12.2%) ¹⁰³.

I.5.6.4. Prévention

Le but de cette prévention est de réduire au maximum le risque de transmission par les patients et le personnel de santé y compris les personnes chargées du nettoyage et de l'entretien. Les moyens sont multiples et diverses allant du lavage des mains à la formation du personnel en passant par le port de gants, la décontamination, le nettoyage, la stérilisation ou la désinfection à haut niveau des instruments chirurgicaux, du matériel et des surfaces. L'utilisation de solutions antiseptiques pour nettoyer les plaies ou préparer la peau avant une intervention chirurgicale, le respect des procédures aseptiques et l'antibioprophylaxie, sont également indispensables ¹⁰⁸.

References bibliographiques

1. J. A. McCleverty, T.J.Meyer, *Comprehensive Coordination Chemistry II : From Biology to Nanotechnology*, Elsevier, Oxford, USA (2004) 8400.
2. A.P. Mishra, R.K. Jain, Microwave synthesis, spectroscopic, thermal and biological significance of some transition metal complexes containing heterocyclic ligands, *J. Chem. Pharm. Res.* **2** (2010) 51-61.
3. K.A .Maher, S.R. Mohammed, metal complexes of schiff base derived from salicylaldehyde-a review, *International Journal of Current Research and Review*, **7** (2015) 6-16.
4. F.Lions, F.K.V.Martin, Synthesis and characterisation of some platinum metal with multidentate ligands, *J. Am. Chem. Soc.* **82** (1960) 2733-2738.
5. J. N. Armor, H. A. Scheidegger, H. Taube, A bimolecular mechanism for substitution, *J. Am. Chem. Soc.* **90** (1968) 5928-5929.
6. R. M. Crook, B. I. Lemon, Li Sun, L. K. Yeung, M.Zhao, Dendrimer-Encapsulated Metals and Semiconductors : Synthesis, Characterization, and Applications, *Dendrimers III*, **212** (2000) 81-135.
7. M.Usharani, E.Akdla, R. Ashokan, R.Rajavi, Pharmacological Properties of Schiff Base Metal Complexes Derived from Substituted Pyridine and Aromatic Amine—A Review *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Health Care*, **5** (2013) 1-11.
8. D.Sinha, A.K.Tiwari, S.Singh, G.Shukla, P.Mishra, H.Chandra , A.K.Mishra, Synthesis, characterization and biological activity of Schiff base analogues of indole-3 carboxaldehyde, *Eur.J. Med. Chem.* **43** (2008) 160-165.
9. J. Hine and C.Y. Yeh, Equilibrium in formation and conformational isomerization of imines derived from isobutyraldehyde and saturated aliphatic primary amines, *J. Am. Chem. Soc.* **89** (1967) 2669-2676.
10. C. Spinu, M. Pleniceanu, C. Tigae, Biologically Active Transition Metal Chelates with a 2-Thiophenecarboxaldehyde-Derived Schiff Base: Synthesis, Characterization, and Antibacterial Properties, *Turk. J. Chem.* **32** (2008) 487-489.
11. A. M.Atria, J.C. MunÄoz, A.Âs Soto, M. T.Garlandb, R. Baggiod, Three yttrium crotonate complexes with diimines, *Inorg. Chim. Acta.* **59** (2003) 416 - 420.
12. M. A. Elbayoumi, M. EL-Aasser et F. Abdel-Halim, Electronic Spectra and Structures of Schiff's Bases, *J. Am. Chem. Soc.* **93** (1971) 586-590.
13. K. Kubono , N. Hirayama, H. Kokusen , K. Yokoi , X-ray crystallographic approach to the design of phenolic Schiff base reagents for the mutual separation of lanthanoids, *Anal. Sci.* **17** (2001) 193-197.

14. M.Hadj Youcef, D. Barkat, T. Benabdallah, Behaviour study of some bidentate o-hydroxy Schiff base extractants in the removal of copper (II) by solvent extraction technique. *J. Saudi.Chem. Soc.* **10** (2006) 15-20.
15. O. Gerngross, A. Olcay, Synthesis of benzylideneglycine ethyl ester and comments on the stability of the azomethine group in Schiff bases, *Chem. Ber.* **96** (1963) 2550-2555.
16. A. P. Dobbs and S. Rossiter, Imines and their N-substituted derivatives: NH, NR, and N-Haloimines, in *Comprehensive Organic Functional Group Transformations II*, R. K. Alan and R. J. K. Taylor, Eds, Elsevier, Oxford, UK, (2005) 419-450.
17. M. Köse, G. Ceyhan, M.Tümer, I. Demirtaş, I. Gönül, V.cKee, Monodentate Schiff base ligands: Their structural characterization, photoluminescence, anticancer, electrochemical and sensor properties, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **137** (2015) 477-485.
18. C. Karakaya , B. Dede, E. Cicek, Novel Metal (II) Complexes with Bidentate Schiff Base Ligand: Synthesis, Spectroscopic Properties and Dye Decolorization Functions, *ACTA PHYSICA POLONICA A*, **129** (2016) 208-212.
19. E. Gungor, S. Celen, D.Azaz, H.Karaa, Two tridentate Schiff base ligands and their mononuclear cobalt (III) complexes: Synthesis, characterization, antibacterial and antifungal activities, *Spectrochimica Acta Part A*, **94** (2012) 216-221.
20. P. A. Vigat, S. Tamburini, The Challenge of Cyclic and Acyclic Schiff Bases and Related Derivatives, *Coordination Chemistry Reviews*, **248** (2004) 1717-2128.
21. M. Mikuriya , Y. Hashimoto , A. Kawamori, Synthesis of a Tetranuclear Manganese Complex with a Cubane Core at the Mn^{II}Mn^{III} Mn^{II}Mn^{III} Oxidation Level, *Chem.Lett*, **24** (1995) 1095-1096.
22. V.P. Pfeiffer T. Tsumaki, E. Breith, E. Liibbe, Tricyclic orthocondensed minor valence rings, *Eur.J.O.Chem.* **492** (1932) 84-128.
23. K. Ouari, A. Ourari, J. Weiss, Synthesis and Characterization of a Novel Unsymmetrical Tetradentate Schiff Base Complex of Zinc (II) Derived from *N,N'*-bis (5-Bromosalicylidene) 2,3-Diaminopyridine (H₂L): Crystal Structure of [Zn(II)L]Pyridine, *J. Chem. Crystallogr.* **40** (2010) 831-836.
24. S. Sobha, R. Mahalakshmi, N. Raman, Studies on DNA binding behaviour of biologically active transition metal complexes of new tetradentate N₂O₂ donor Schiff bases: Inhibitory activity against bacteria, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **92** (2012) 175-183.
25. M. Asadi, Z. Asadi, S.B. Sadi, L. Zarei, F.M. Baigi, Z. Amirghofran, Synthesis, characterization and the interaction of some new water-soluble metal Schiff base complexes with human serum albumin, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **122** (2014) 118-129.

26. M. Khorshidifard, H. Amiri Rudbari, Z.Kazemi-Delikani, V. Mirhani, V. Mirkhani, R. Azadbakht, Synthesis, characterization and X-ray crystal structures of Vanadium (IV), Cobalt(III), Copper(II) and Zinc(II) complexes derived from an asymmetric bidentate Schiff-base ligand at ambient temperature, *Journal of Molecular Structure*, **1081** (2015) 494-505.
27. S.A. Mousavi, M. Montazerzohori, A. Masoudiasl, Gh. Mahmoudi, Jonathan M. White, Sonication-assisted synthesis of a new cationic zinc nitrate complex with a tetradentate Schiff base ligand: Crystal structure, Hirshfeld surface analysis and investigation of different parameters influence on morphological properties, *Ultrasonics Sonochemistry*, **3** (2018) 1-25.
28. S. Shahraki, A. Heydari, New zinc (II) N₄ tetradentate Schiff base complex: A potential cytotoxic metallodrug and simple precursor for the preparation of ZnO nanoparticles, *Colloids and Surfaces B Biointerfaces*, **160** (2017) 564-571.
29. I. Rajaei, S. Nezamoddin Mirsattari, Spectroscopic characteristic (FT-IR, ¹H, ¹³C NMR and UV-Vis) and theoretical calculations (MEP, DOS, HOMO-LUMO, PES, NBO analysis and keto-enol tautomerism) of new tetradentate N,N'-bis(4hydroxysalicylidene)-1,4-phenylenediamine ligand as chelating agent for the synthesis of dinuclear Co(II), Ni(II), Cu(II) and Zn(II) complexes, *Journal of Molecular Structure*, **1163** (2018) 236-251
30. DN .Dhar, CL.Taploo, Schiff-bases and their applications, *J Sci. Ind. Res. India*. **41** (1982) 501-506.
31. LH.Abdel-Rahman, AM. Abu-Dief, MSS. Adam, SK. Hamdan, Some New Nano-sized Mononuclear Cu (II) Schiff Base Complexes: Design, Characterization, Molecular Modeling and Catalytic Potentials in Benzyl Alcohol Oxidation, *Catal Lett*, **146** (2016) 1373-1396.
32. K. Sztanke, A. Maziarka, A. Osinka, M.Sztanke, An insight into synthetic Schiff bases revealing antiproliferative activities *in vitro*, *Bioorgan Med Chem*, **21** (2013) 3648-3666.
33. D. Utreja, S. Singh, M. Kaur, Schiff bases and their metal complexes as anti-cancer agents: A review. *Curr Bioact Compd*, **11** (2015) 215-230.
34. G. Bringmann, M. Dreyer, JH. Faber, PW. Dalsgaard, D. Stærk, JW. Jaroszewski, Ancistrotanine C and Related 5, 1 and 7, 3 -Coupled Naphthylisoquinoline Alkaloids from *Ancistrocladus tanzaniensis*, *J Nat Prod*, **67** (2004) 743-748.
35. M-U-Hassan, Z H. Chohan, A. Scozzafava, C T. Supuran, Carbonic Anhydrase Inhibitors: Schiff's Bases of Aromatic and Heterocyclic Sulfonamides and their Metal Complexes, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, **19** (2004) 263-267.
36. S. Abbas, HH. Nasir, S. Zaib, S. Ali, T. Mahmood, K. Ayub, M N Tahir, I.Jamshed, Carbonic anhydrase inhibition of Schiff base derivative of imino-methyl-naphthalen2-ol: Synthesis, structure elucidation, molecular docking, dynamic simulation and density functional theory calculations, *Journal of Molecular Structure*, **11** (2017) 5-24.

37. C. Follmer, CR. Carlini, Effect of chemical modification of histidines on the copper-induced oligomerization of jack bean urease (EC 3.5.1.5), *Arch Biochem Biophys*, **1** (2005) 15-20.
38. S. kiran, d.p. Singh, M S. Barwa, P. Tyagi, Y. Mirza, Antibacterial Co(II), Ni(II), Cu(II) and Zn(II) Complexes of Schiff bases Derived from Fluorobenzaldehyde and Triazoles, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, **21** (2006) 557-562.
39. P. Luca, G. Fasolis, D. Vullo, Z H. Chohan, A. Scozzafava, C T. Supuran, Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of cytosolic/tumor-associated carbonic anhydrase isozymes I, II, IX, and XII with Schiff's bases incorporating chromone and aromatic sulfonamide moieties, and their zinc complexes, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **15** (2005) 3096-3101.
40. Yu-GuangLi, D-H. Shi, H-L. Zhu, H. Yan, S. WengNg, Transition metal complexes (M = Cu, Ni and Mn) of Schiff-base ligands: Syntheses, crystal structures, and inhibitory bioactivities against urease and xanthine oxidase, *Inorganica Chimica Acta*, **9** (2007) 2881-2889.
41. MAS. Aslam, S-u. Mahmood, M. Shahid, A. Saeed, J. Iqbal, Synthesis, biological assay in vitro and molecular docking studies of new Schiff base derivatives as potential urease inhibitors, *Eur J Med Chem*, **46** (2011) 5473-5479.
42. X. Dong, Y. Li, Z. Li, D. Gong, H-L. Zhu, Synthesis, crystal structure, and urease inhibition studies of copper (II) and cobalt(III) complexes with bi(2 fluorobenzylaminoethyl) amine, *Transit Metal Chem*, **36** (2011) 319-324.
43. C.Yongming, X. Dong, Y. Li, Z. Li, W. Chen, Synthesis, structures and urease inhibition studies of Schiff base metal complexes derived from 3,5-dibromosalicylaldehyde, *Transit Metal Chem*, **58** (2012) 323-331.
44. A. Saeed, A. Imran, PA. Channar, M. Shahid, W. Mahmood, J. Iqbal, 2 (Hetero(aryl)methylene)hydrazine-1-carbothioamides as Potent Urease Inhibitors, *Chem Biol Drug Des*, **85** (2015) 225-230.
45. F. Rahim, M. Shehzad, A. Khan, M.Taha, MT. Quereshi, I. Tauseef, Synthesis and Antiurease & Antioxidant Activities of Bis-Schiff Bases of Isophthalaldehyde, *Asian J Chem*, **28** (2016) 39-42.
46. P. Elena, D-C. Ilieş, S. Shova, C. Paraschivescu, M. Badea, A. Gulea, T. Roşu, Synthesis, Characterization, Crystal Structure and Antimicrobial Activity of Copper(II) Complexes with the Schiff Base Derived from 2-Hydroxy-4-Methoxybenzaldehyde, *Molecules*, **20** (2015) 5771-5792.
47. D. Karuthamohamed, M P. Kesavan, G G V. Kumar, L. Ravi, G. Rajagopal, J. Rajesh, Crystal structure, optical properties, DFT analysis of new morpholine based Schiff base ligands and their copper (II) complexes: DNA, protein docking analyses, antibacterial study and anticancer evaluation, *Materials Science & Engineering C*, **4** (2018) 1-38.
48. D.M. Livermore, The -lactamase threat in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas and Acinetobacter*, *Trends Microbiol*, **14** (2006) 413-420.

49. D.M. Livermore, Fourteen years in resistance, *Int. J. Antimicrob. Chemother.* **39** (2012) 283-294.
50. E. Sauvage, F. Kerff, M. Terrak, The penicillinbinding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis, *FEMS Microbiol Rev*, **32** (2008) 234-258.
51. P.D. Cotter, C. Stanton, R.P. Ross, C. Hill, The impact of antibiotics on the gut microbiota as revealed by high throughput DNA sequencing, *Dis.Med.***13** (2012)193-199.
52. K. Bush, The coming age of antibiotics: discovery and therapeutic value, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **12** (2010) 1- 4.
53. G.B. Mahajan, L. Balachandran, Antibacterial agents from actinomycetes- a review, *Front. Biosci.* **4** (2012) 240-253.
54. L.M. Cavaco, H. Hasman, S. Xia, F.M. Aarestrup, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* sérovar Kentucky and *Bovismorbificans* strains of human origin, *Antimicrob. Agents. Chemother.* **53** (2009) 603-608.
55. H.C. Neu, Aztreonam activity, pharmacology and clinical uses, *Am. J. Med.***88** (1990) 2-5.
56. K.M. Papp-Wallace, A. Endimiani, M.A. Taracila, R.A. Bonomo, Carbapenems: past, present, and future, *Antimicrob Agents Chemother*, **55** (2011) 4943-4960.
57. L. Guardabassi, P. Courvalin, Modes of antimicrobial action and mechanisms of bacterial resistance, *Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin.* ASM Press, **11** (2006) 1-18.
58. H. Nikaido, Multidrug resistance in bacteria, *Annu. Rev. Biochem.* **78** (2009) 119-146.
59. S.M. Drawz, R.A. Bonomo, Three Decades of β -Lactamase Inhibitors, *Clinical Microbiology Review*, **23** (2010) 167-171.
60. M. Archambaud, Les Antibiotiques : mode d'action et mécanisme de résistance. Laboratoire de Bactériologie-Hygiène CHU Rangueil–Toulouse, (2009) 60.
61. M.N. Alekshun, S.B. Levy, Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance, *Cell, Leading Edge Review*, **128** (2007) 1037-1050.
62. H. Knothe, P. Shah, V. Krcmery, M. Antal, S. Mitsuhashi, Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*, *Infection*, **11** (1983) 315-317.
63. C. Kliebe, B.O.A. Nies, J.F. Meyer, R.M. Neutzling, B. Wiedemann, Evolution of plasmid-coded-resistance to broad spectrum cephalosporins, *Antimicrob Agents Chemother*, **28** (1985) 302-307.
64. T. Coque, F. Baquero, R. Canton, Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe, *Eurosurveillance*, **13** (2008) 1-11.
65. L. Poirel, P. Kampfer, P. Nordmann, Chromosome-encoded Ambler class A beta-lactamase of *Kluyvera georgiana*, a probable progenitor of a subgroup of CTX-M extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, **46** (2002) 4038-40.

66. E. Ruppe, A. Andremont, Le microbiote intestinal est l'avenir de la multirésistance bactérienne, *Journal des anti-Infectieux*, **15** (2013) 166-177.
67. R. Bonnet, Growing group of extended-spectrum beta-lactamases, the CTX-M. Enzymes, *Antimicrob Agents Chemother*, **48** (2004) 1-14.
68. T. Palzkill, Metallo-lactamase structure and function. *Ann N Y Acad Sci*, **1277** (2013) 91-104.
69. A. Kimberly, H J. Toussaint, C.Jason and B. Gallagher, β -Lactam/ β -Lactamase Inhibitor Combinations: From Then to Now, *Annals of Pharmacotherapy*, **31** (2014) 1-13.
70. S.N. Maiti, B-R. P. Kamalesh, R. Shan, Overcoming Bacterial Resistance: Role of β -Lactamase Inhibitors, *Top Heterocycl Chem*, **2** (2006) 207–246.
71. M.David, β -Lactamases in Laboratory and Clinical Resistance, *Clin Microbiol Rev*, **8** (1995) 557–584.
72. K.S.Thomson, E.S.Moland, the new β -lactamases of Gram-negative bacteria at the dawn of the new millennium, *Microbe Infect*, **2** (2000) 1225-1235.
73. M. A. Babic, Hujer, R.A. Bonomo, What's new in antibiotic resistance Focus on beta-lactamases, *Drug Resist Update*, **9** (2006) 142-156.
74. L.D.Sabath and EOP. Abraham, Zinc as a cofactor for cephalosporinase from *Bacillus cereus* 569, *Biochem J*, **98** (1996) 11-13.
75. L. Chantalat, E. Duée, M. Galleni, J.M. Frère, O.T. Dideberg, Structural effects of the active site mutation cysteine to serine in *Bacillus cereus* zinc-b-lactamase, *Protein Science*, **9** (2000) 1402–1406.
76. G.M. Rossolini, J.D. Docquier, Class B β -lactamases, Enzyme-mediated resistance to antibiotics: mechanisms, dissemination, and prospects for inhibition. ASM Press, Washington, DC, (2007) 115-144.
77. Y.Saino, F. Kobayashi, M. Inoue and S. Mitsunashi Purification and Properties of Inducible Penicillin, Beta- Lactamase Isolated from *Pseudomonas maltophilia*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **4** (1982) 564-570.
78. K. Bush, New β -lactamases in gram-negative bacteria, *Antimicrob. Res.* **32**(2001) 1085-89.
79. M. Zubair, A. Malik, J. Ahmad, Prevalence of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from diabetic foot ulcer patients. Diabetes & Metabolic Syndrome, *Clinical Research & Reviews*, **5** (2011) 90-92.
80. P. Cornelis, *Pseudomonas* Genomics and molecular biology .Antibiotic resistance in pseudomonas. *Caister academic press*,**22** (2008) 188-189.
81. M. Watanabe, S. Iyobe, M. Inoue, S. Mitsunashi, Transferable Imipenem Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **35** (1991) 147-151.

82. S. Pollini, S. Maradei, P. Pecile, G. Olivo, F. Luzzaro, J.D. Docquier and G.M.Rossolini, FIM-1, a New Acquired Metallo- β -Lactamase from a *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolate from Italy, *Antimicrob. Agents Chemother*, **57** (2013) 410 - 416.
83. I.Michael and A.Badarau, The Mechanisms of Catalysis by Metallo- β -Lactamases. *Bioinorg. Chem. Appl*, **10**(2008) 1-14.
84. F.M. Mojica, R.A. Bonomo, W. Fast, B1-Metallo-beta-Lactamases: Where do we stand, *Curr Drug Targets*, **17** (2016) 1029–1050.
85. M. R. Meini, L. I. Llarrull, A J. Vila, Overcoming differences: the catalytic mechanism of metallo- β -lactamases, *FEBS Letters*, **14** (2015) 3419-3432.
86. C. Bebrone, Metallo- β -lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and theirsuperfamily, *Biochem Pharmacol*, **74** (2007) 1686-1701.
87. N.P. Sharma, Structure/function studies on metallo- β -lactamase ImiS FROM Aeromonas Bv. Sobria. Thèse de doctorat en physiologie, Université de Miami, Oxford, Ohio, (2007).
88. J.M. González, F.J. Medrano Martín, A. L. Costello, D. L.Tierney, A. J. Vila, 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** (2007) 1141-1156.
89. M.W. Crowder, T.R.Walsh, L. Banovic, M. Pettit, J. Spencer, Overexpression, Purification, and Characterization of the Cloned Metallo-b-Lactamase L1 from *Stenotrophomonas maltophilia*, *Antimicrob Agents Chemother*, **42** (1998) 921-926.
90. Z. Wang, W. Fast, A.M. Valentine, S. J. Benkovic, Metallo- β lactamase: structure and mechanism, *Curr Opin Chem Biol*, **3** (1999) 614-622.
91. J.H. Ullah, T.R. Walsh, I.A. Taylor, D.C. Emery, C.S. Verma, S.J. Gambin, J. Spencer, The crystal structure of the L1 metallo-beta-lactamase from *Stenotrophomonas maltophilia* at 1.7 Å resolution, *J. Mol. Biol.* **284** (1998) 125-136.
92. P. Hinchliffe, M.M. González, M.F. Mojica, J.M. González, V. Castillo, C. Saiz, M. Kosmopoulou, C.L. Tooke, L.I. Llarrull, G. Mahler, R.A. Bonomo, A.J. Vila, J. Spencer, Cross-class metallo- β -lactamase inhibition by bisthiazolidines reveals multiple binding modes. *PNAS*, **113** (2016) 3745-3754.
93. A.I. Karsisiotis, C. Damblon, G.C.K. Roberts, "A variety of roles for versatile zinc in metallo- β -lactamases", *Metallomics*, **6** (2014) 1181-1197.
94. M. Galleni, J. Lamotte-brasseur, G.M. Rossolini, J. Spencer, O. Dideberg, J.M. Freère, The metallo-b-lactamase working group. Standard numbering scheme for class B β -lactamases, *Antimicrob Agents Chemother*, **45** (2001) 660-663.
95. D.J. Payne, W. Du, J.H. Bateson, β -lactamase epidemiology and the utility of established and novel β -lactamase inhibitors, *Expert Opin Investig Drugs*, **9** (2000) 247-261.

96. G. Cornaglia, H. Giamarellou, G.M. Rossolini, Metallo- β -lactamases: a last frontier for β -lactams, *Lancet Infect Dis*, **11** (2011) 381-393.
97. P. Nordmann, A. Carrer, Les carbapénèmases des entérobactéries, *Arch Pediatr*, **17** (2010) 154-162.
98. D.V. Duina, Y. Doib The global epidemiology of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, *Virulence*, **8** (2017) 460-469.
99. F. Robin, N. Aggoune-Khinache, J. Delmas, M. Naim, R. Bonnet, Novel VIM Metallo- β -Lactamase Variant from Clinical Isolates of Enterobacteriaceae from Algeria. *Antimicrob Agents Chemother*, **54** (2010) 466-470.
100. D.K. Kakupa1, P.K. Muenze, B. Byll, M.D.Wilmet, Etude de la prévalence des infections nosocomiales et des facteurs associés dans les deux hôpitaux universitaires de Lubumbashi, République Démocratique du Congo: cas des Cliniques Universitaires de Lubumbashi et l'Hôpital Janson Sendwe , *Pan Afr Med J*, **30** (2016) 275-280.
101. H.A. Khan, A. Ahmad, R. Mehboob, Nosocomial infections and their control strategies. *Asian Pac J Trop Biomed*, **5** (2015) 509-514.
102. P. Berthelot, F. Grattard, F.O. Mallaval, A. Ros, F. Lucht, B. Pozzetto, Épidémiologie des infections nosocomiales à *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* et *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pathol Biol*, **53** (2005) 341-348.
103. A. Bezzaoucha, E. Makhlouf, N. Dekkar, N. Lamdjadan, Prévalence des infections nosocomiales au centre hospitalo-universitaire de Bab El Oued-Alger, *Méd Mal Infect*, **24** (1994) 96-101.
104. H.A. Khan, F.K. Baig, R. Mehboob, Nosocomial infections: epidemiology, prevention, control and surveillance, *Asian Pac J Trop Biomed*, **6** (2016) 639-660.
105. D.M. Allen, B.J. Hartman, Principles and Practice of Infectious Diseases, 5th Edition. *Philadelphia: Churchill Livingstone*, **2** (2000) 2339-44.
106. B. Kaoutara, C. Jolya, F. L'He'riteaua, F. Barbutb, J. Robertc, M. Denisd, F. Espinassee, J. Merrerf, C. Doitg, Y. Costah, F. Daumali, H.S. Blanchardj, Eveillardk, A.H. Botherela, G. Brückerl, P. Astagneau, Nosocomial infections and hospital mortality : a multicentre epidemiological study, *J Hosp Infect*, **58** (2004) 268-275.
107. K. Amazian, J. Rossello, A. Castella, S. Sekkat, S. L. Terzaki, Dhidah, T. Abdelmoumène, J. Fabry et les membres du réseau NosoMed, Prévalence des infections nosocomiales dans 27 hôpitaux de la région méditerranéenne, *EMHJ*, **16** (2010) 1070-1078.
108. M. Seffar, M. Zouhdi, Prévention des infections nosocomiales, *Maroc Médical*, **27** (2005) 113-120.

CHAPITRE II

Synthèse et caractérisation des ligands bases de Schiff et de leurs complexes de zinc

Dans ce chapitre nous décrivons les procédés de la synthèse, de la caractérisation des ligands bases de Schiff tétradentates symétriques et non symétriques ponté au pyridine, au benzène, au propyle, et au éthyle ainsi que leurs complexes de zinc (II).

II.1. Mesures physico-chimiques

II.1.1. Chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couche mince (CCM) repose principalement sur les phénomènes d'affinité chimique du soluté sur la phase stationnaire ou d'adsorption. La phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants qui progressent en entraînant le soluté le long de la phase stationnaire fixée sur un support rigide, en verre, en plastique ou en aluminium.

Après dépôt du soluté sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse dépendante de leur nature et de celle du solvant caractérisée par un rapport frontal (R_f) défini par l'expression : $R_f = d_{\text{substance}} / d_{\text{solvant}}$

- d_{sub} : Distance parcourue par le composé.

- d_{sol} : Distance parcourue par le solvant.

II.1.2. Température de fusion

La table chauffante de **Köfler-7797**, appelée en pratique bench Köfler est un appareil de mesure permettant de mesurer la température de fusion d'une matière. Il s'agit d'une plaque chauffante présentant un gradient de température, la température varie de 40°C à 250°C, sur laquelle on déplace un échantillon. La détermination du point de fusion est une donnée physique importante d'une substance.

II.1.3. Conductimétrie

La conductimétrie permet de mesurer les propriétés conductrices d'une substance en solution. En pratique, on détermine la conductance G d'un volume d'une solution à l'aide d'une cellule de mesure constituée de deux plaques parallèles de surface immergée S et séparées d'une distance L . La conductance a été mesurée avec un appareil Conductivity Meter MeterLab **CDM-210**.

II.1.4. Analyse élémentaire

Les échantillons sont également soumis à une analyse élémentaire afin d'évaluer leurs degré de pureté. Les analyses ont été conduites par un appareil de type **Elementar-Vario EL III-CHNOS** à l'Institut Européen de Chimie de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg.

II.1.5. Infrarouge (IR)

Les analyses en infrarouge ont été menées sur un spectrophotomètre **Perkin-Elmer 1000 FTIR** à double faisceau, muni d'un système d'acquisition à transformée de Fourier, le KBr est le support utilisé pour la préparation des pastilles, les spectres sont tracés entre 400 et 4000 cm^{-1} .

II.1.6. Ultraviolet -Visible (UV-Vis)

L'étude par absorption UV-Vis des ligands base de Schiff et de leurs complexes a été conduite sur un spectrophotomètre **Unicam UV-300**. La cellule d'étude, en quartz, est de 1 cm d'épaisseur, le solvant adéquat pour mener cette étude est le diméthylformamide (DMF). Les spectres électroniques ont été tracés dans l'intervalle de 200 à 700 nm.

II.1.7. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Les spectres RMN du proton (RMN ^1H) et la RMN du carbone 13 (RMN ^{13}C) unidimensionnelle (**1D**) des ligands **H₂L** et des complexes diamagnétiques de **Zn(II)** ont été enregistrés à l'aide d'un spectromètre **Bruker Avance 400 MHz** à l'Institut Européen de Chimie (Strasbourg). Le solvant deutéré le mieux adapté pour nos composés est le chloroforme deutéré (CDCl_3). Les déplacements chimiques sont donnés en ppm par rapport au tétraméthylsilane (TMS) comme référence interne.

II.2. Synthèse des ligands

II.2.1. Réactifs et solvants utilisés

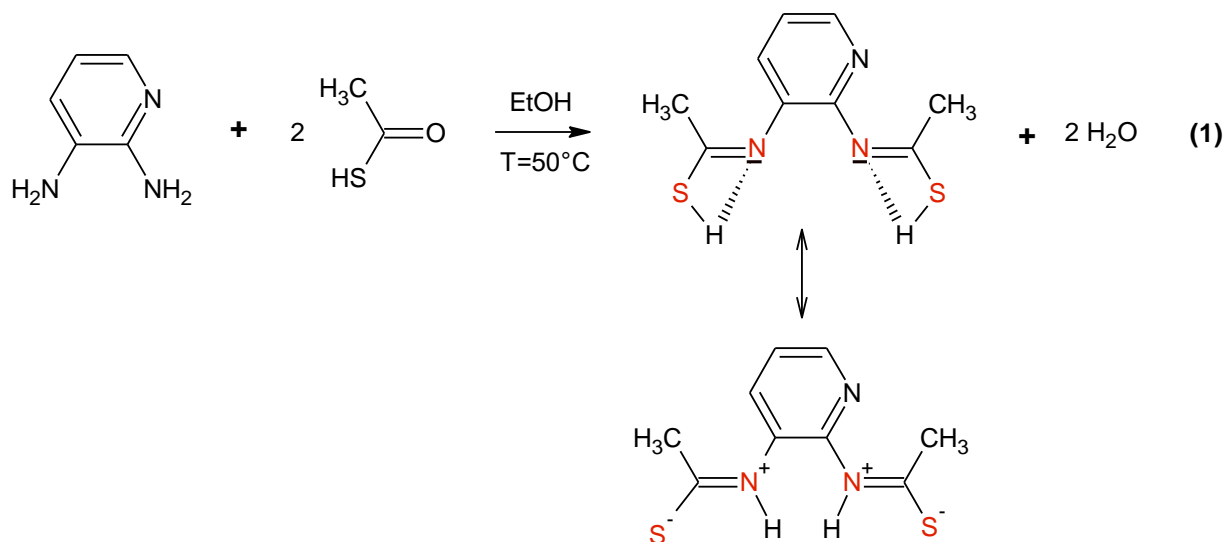
Tous les produits chimiques, réactifs et solvants utilisés pour la préparation des ligands bases de Schiff et des complexes de zinc correspondants, proviennent de Sigma-Aldrich. Ils sont utilisés sans purification préalable. Il s'agit des molécules suivantes : 2,3-diaminopyridine, 1,2-éthylène diamine, 1,2- diaminobenzène, 1,3-propylène diamine, salicylaldehyde, acide thioacétique, acétate de zinc ($[\text{COOCCH}_3]_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), pyridine, dichlorométhane, méthanol (MeOH), éthanol (EtOH), diméthylformamide (DMF) et diméthylsulfoxyde (DMSO).

II.2.2. Synthèse des ligands au pont pyridine

Dans un ballon de 50 ml de volume surmonté d'un réfrigérant contenant 0.109 g (1 mmole) de 2,3-diaminopyridine dissoutes dans 10 ml d'éthanol (EtOH), sont ajoutés 0.152 g (2 mmole) d'acide thioacétique dissoute dans 8 ml d'éthanol (EtOH). Le mélange obtenu est agité à 50 °C et sous atmosphère d'azote jusqu'à ce qu'il devienne marron, indiquant que la base de Schiff est formée. Le précipité obtenu a été séparé par filtration, lavé avec de petites

portions d'éthanol froid et ensuite avec de l'éther diéthylique. La pureté de ligand a été contrôlée par chromatographie sur couche mince (CCM), en utilisant le dichlorométhane/méthanol (CH₂Cl₂/MeOH : 9.5/0.5, v/v) comme éluant. Le solide résultant a été séché sous vide dans un dessiccateur en présence de CaCl₂.

Le schéma réactionnel de la synthèse du ligand **H₂L¹** est représenté par l'équation 1 suivante :



acide *N, N'*-pyridine-2,3- diylthioimidothioïque : **H₂L¹**.

Schéma 1. Protocole de synthèse de ligand base de Schiff **H₂L¹**.

II.2.3. Synthèse du ligand au pont benzène

Dans un ballon de 50 ml de volume surmonté d'un réfrigérant contenant 108 mg (1 mmol) de 1,2-diaminobenzène dissoutes dans 10 ml d'éthanol (EtOH), sont ajoutés 0.244 g (2 mmole) de salicylaldehyde pour **H₂L²** ou de 0.152 g (2 mmole) du thioacetic acid pour **H₂L³** dissoutes dans 8 ml d'éthanol (EtOH). Chacun de deux mélanges est agité à 50 °C et sous atmosphère d'azote jusqu'à ce qu'il formation d'un précipité de couleur orange et marron, respectivement. Les deux précipités obtenus ont été séparés par filtration, lavés avec de petites portions d'éthanol froid et ensuite avec de l'éther diéthylique. La pureté de ces ligands a été contrôlée par chromatographie sur couche mince (CCM), en utilisant le dichlorométhane/méthanol (CH₂Cl₂/MeOH : 9.5/0.5, v/v) comme éluant. Le solide résultant a été séché sous vide dans un dessiccateur en présence de CaCl₂.

Le schéma réactionnel de la synthèse est représenté par les équations 2 et 3 suivantes :

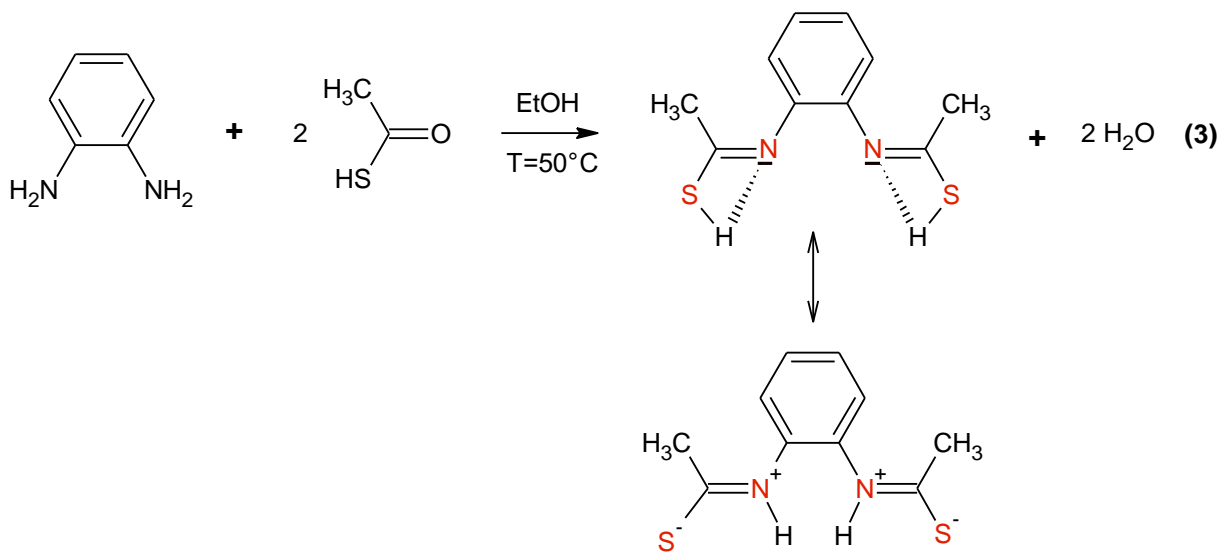
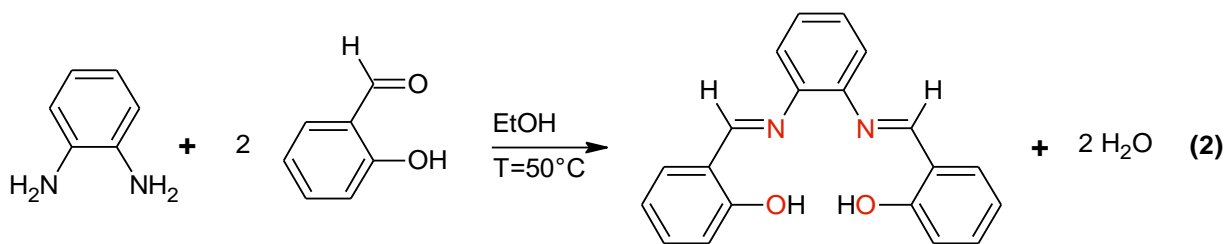
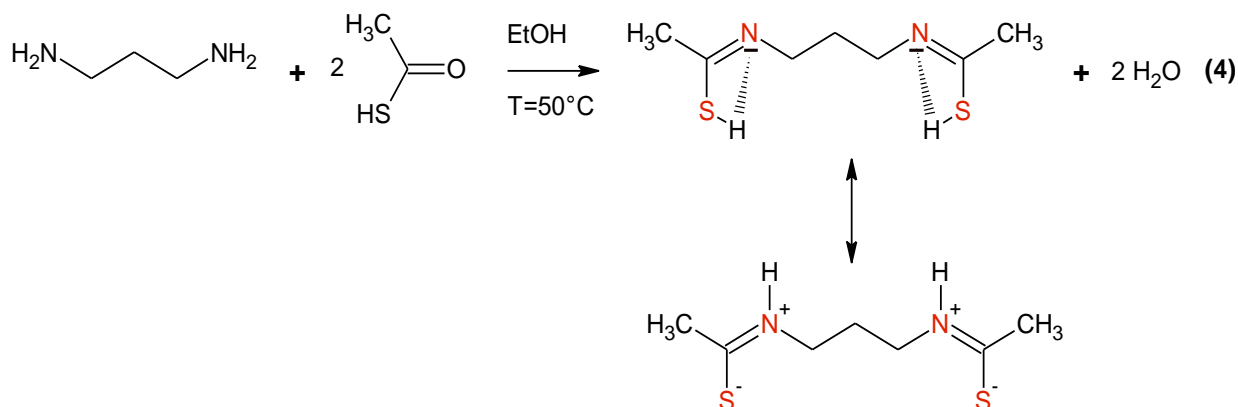


Schéma 2. Protocole de synthèse de ligands bases de Schiff **H₂L²** et **H₂L³**.

II.2.4. Synthèse du ligand au pont propyl

Dans les mêmes conditions que précédemment, 0.088 g (1 mmole) du 1,3-propylène diamine dissoutes dans 10 ml d'éthanol (EtOH), sont ajoutés 0.152 g (2 mmole) d'acide thioacétique dissoute dans 8 ml d'éthanol (EtOH). Le mélange obtenu est agité à 50 °C et sous atmosphère d'azote jusqu'à ce qu'il devienne jaune pâle. Le précipité obtenu a été séparé par filtration, lavé avec de petites portions d'éthanol froid et ensuite avec de l'éther diéthylique. La pureté de ce ligand a été contrôlée par chromatographie sur couche mince (CCM), en utilisant le dichlorométhane/méthanol (CH₂Cl₂/MeOH : 9.5/0.5, v/v) comme éluant. Le solide résultant a été séché sous vide dans un dessiccateur en présence de CaCl₂.

Le schéma réactionnel de la synthèse du ligand **H₂L⁴** est représenté par l'équation ci-après :



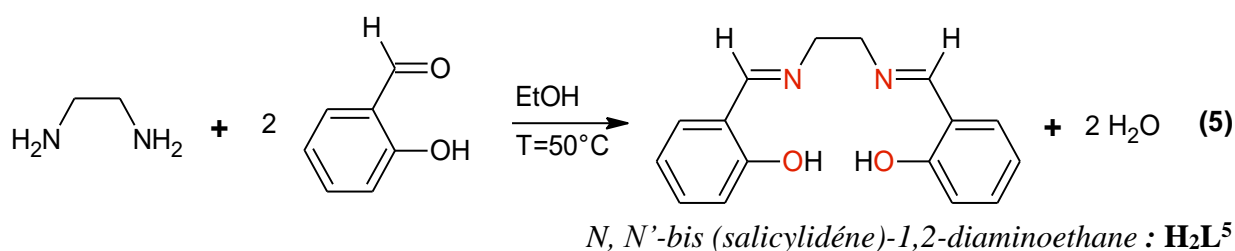
acide *N, N'*-(1, 3-propylidène) diethanimidothioïque : **H₂L⁴**.

Schéma 3. Protocole de synthèse du ligand base de Schiff **H₂L⁴**.

II.2.5. Synthèse du ligand au pont éthyle

Dans un ballon de 50 ml de volume surmonté d'un réfrigérant contenant 0.060 g (1 mmole) du 1,2-éthylène diamine dissoutes dans 10 ml d'éthanol (EtOH), sont ajoutés 0.244 g (2 mmole) du salicylaldehyde dissoute dans 8 ml d'éthanol (EtOH). Le mélange obtenu est agité à 50 °C et sous atmosphère d'azote jusqu'à ce qu'il devienne marron, indiquant que la base de Schiff est formée. Le précipité obtenu a été séparé par filtration, lavé avec de petites portions d'éthanol froid et ensuite avec de l'éther diéthylique. La pureté de ligand a été contrôlée par chromatographie sur couche mince (CCM), en utilisant le dichlorométhane/méthanol (CH₂Cl₂/MeOH : 9.5/0.5, v/v) comme éluant. Le solide résultant a été séché sous vide dans un dessiccateur en présence de CaCl₂.

Le schéma réactionnel global de la réaction de synthèse du ligand **H₂L⁵** est représenté ci-après :



N, N'-bis (salicylidène)-1,2-diaminoethane : **H₂L⁵**

Schéma 4. Protocole de synthèse du ligand base de Schiff **H₂L⁵**.

Les cinq bases de Schiff obtenus ont été synthétisés selon la méthode décrite dans la littérature ¹, les ligands **H₂L¹-H₂L⁵** se présentent respectivement sous forme de cristaux marron, de poudre orange, de cristaux marron, de cristaux jaune pâle et de poudre jaune. L'ensemble de ces composés, obtenus avec d'assez bon rendements variant entre 38 et 71 %, sont initialement

caractérisés par leurs points de fusion qui sont en accord avec ceux rapportés dans la littérature ². Ils sont tout à fait stables à la température ambiante et peuvent être stockés pendant une longue période.

Les principales caractéristiques physico-chimiques des ligands **H₂L** sont portées dans le tableau II.1 suivant :

Tableau II.1. Caractéristiques physico-chimiques des ligands H₂L¹-H₂L⁵.

Ligands	Aspect	Formule brute	ρ(%)	R _f %	Tf C°	Λ (Ω ⁻¹ cm ² mol ⁻¹)
H ₂ L ¹	Cristaux marron	C ₉ H ₁₂ N ₃ S ₂	54	-	230	-
H ₂ L ²	Poudre orange	C ₂₀ H ₁₆ O ₂ N ₂	71	82	212	8.89
H ₂ L ³	Cristaux marron	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ S ₂	42	59	260	3.79
H ₂ L ⁴	Cristaux jaune pâle	C ₇ H ₁₄ N ₂ S ₂	38	64	280	2.58
H ₂ L ⁵	Poudre jaune	C ₁₆ H ₁₆ O ₂ N ₂	63	65	252	2.91

II.3. Synthèse des complexes de zinc

La préparation des complexes **Zn(II)L** à partir d'un rapport équimolaire de ligand **H₂L** et de sel de métaux de transition de zinc est illustrée par les réactions **6** et **7** ci-après:

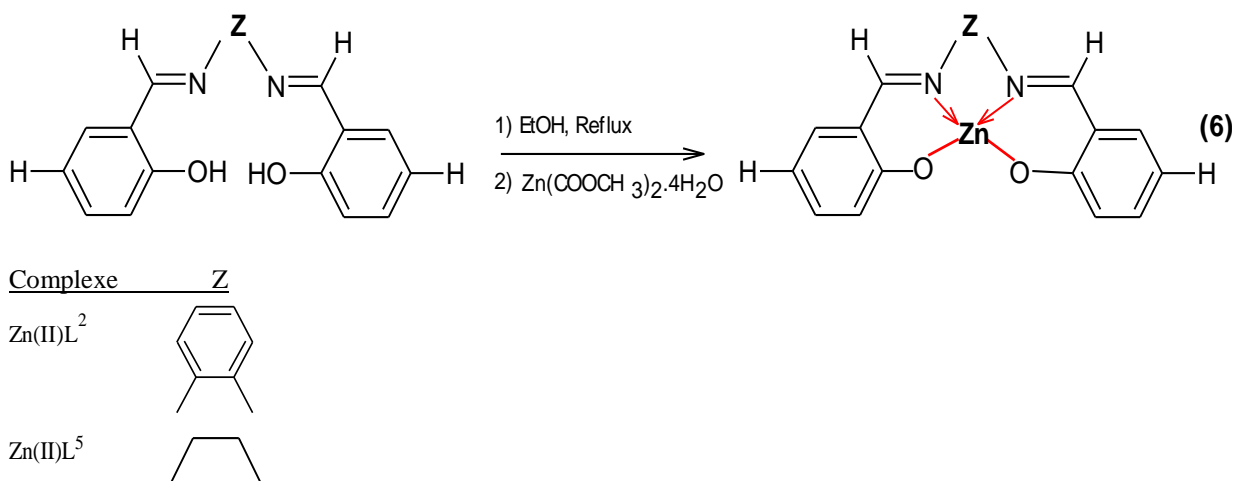
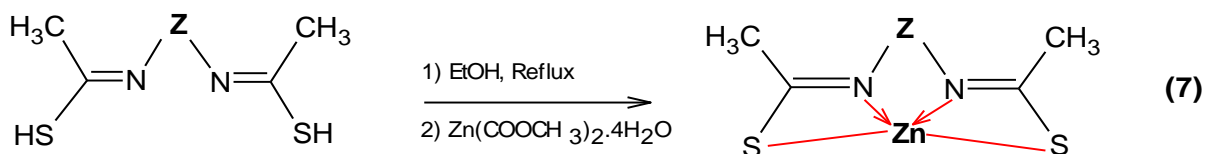


Schéma 5. Protocole de synthèse des complexes Zn(II)L² et Zn(II)L⁵.

Dans un ballon de 50 ml de volume surmonté d'un réfrigérant, contenant 0.5 mmole du ligand **H₂L²** (0.158 g) ou **H₂L⁵** (0.134 g) dissoute dans 10 ml d'éthanol, sont ajoutés 0.5 mmole (0.109 g) d'acétate de zinc tétrahydraté Zn(OOCH₃)₂.4H₂O. Le mélange est porté au reflux sous agitation et sous atmosphère d'azote. La réaction est poursuivie pendant 2 heures.

Un précipité est ensuite observé, de couleur nettement différente du ligand. Le précipité est récupéré par filtration, lavé 2x2 ml d'éthanol puis 2x3 ml d'éther diéthylique. Leur pureté est aussi contrôlée par CCM (gel de silice) avec le CH₂Cl₂/MeOH (9.5/0.5, v/v) comme éluant. Le séchage des complexes est effectué sous vide dans un dessiccateur en présence de CaCl₂ pendant une nuit.



Complexe _____ Z

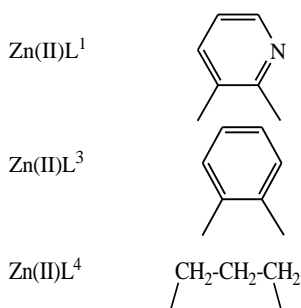


Schéma 6. Protocole de synthèse des complexes Zn(II)L¹, Zn(II)L³ et Zn(II)L⁴.

Dans un ballon de 50 ml de volume surmonté d'un réfrigérant, contenant 0.5 mmole du ligand **H₂L³** (0.113 g) ou **H₂L⁵** (0.112 g) ou **H₂L⁶** (0.95 g) dissoute dans 10 ml d'éthanol, sont ajoutés 0.5 mmole (0.109 g) d'acétate de zinc tétrahydraté Zn(OOCCH₃)₂.4H₂O. Le mélange est porté au reflux sous agitation et sous atmosphère d'azote. La réaction est poursuivie pendant 2 heures. Un précipité de couleur différente du ligand est apparu. Le brut réactionnel du produit de la réaction a subi le même traitement que celui des complexes précédents.

Le tableau II.2 ci-après regroupe les caractéristiques physico-chimiques des complexes de zinc **Zn(II)L**.

Tableau II.2. Caractéristiques physico-chimiques des complexes de zinc Zn(II)L¹- Zn(II)L⁵.

Composé	Couleur	Formule brute	ρ (%)	R _f %	T _f C°	Λ (Ω^{-1} cm ² mol ⁻¹)
Zn(II)L ¹	Marron	C ₉ H ₉ N ₃ S ₂ Zn	34.64	-	>200	-
Zn(II)L ²	Jaune	C ₂₀ H ₁₄ O ₂ N ₂ Zn	71.12	74	>200	6.25
Zn(II)L ³	Marron	C ₁₀ H ₁₀ N ₂ S ₂ Zn	37.01	77	>200	3.87
Zn(II)L ⁴	Blanc	C ₇ H ₁₂ N ₂ S ₂ Zn	33.51	40	>200	1.50
Zn(II)L ⁵	Blanc	C ₁₆ H ₁₄ O ₂ N ₂ Zn	84.43	81	>200	5.47

Il est à noter que les températures de fusion de tous les complexes dépassent les **200°C**, ce qui certainement reflète la stabilité de ces molécules.

Aussi, des tests de solubilité des produits synthétisés ont été effectués en utilisant une série des solvants à savoir la diméthylformamide (DMF), la pyridine et le diméthylsulfoxyde (DMSO). On constate que le ligand **H₂L¹** et son complexe **Zn(II)L¹** ne présente aucune solubilité dans tous les solvants testés. Par contre les autres ligands **H₂L²**, **H₂L³**, **H₂L⁴** et **H₂L⁵** et leurs complexes correspondants présentent une parfaite solubilité dans ces solvants testés. Pour cette raison seules les ligands **H₂L²**, **H₂L³**, **H₂L⁴** et **H₂L⁵** ont été caractérisés et testés en tant qu'inhibiteur de beta-lactamases et de croissance bactérienne.

II.4. Caractérisations et identification des structures

Après synthèse, les structures des ligands et de leurs complexes de zinc ont été élucidées par des techniques d'analyse diverses dont, l'analyse élémentaire, les spectroscopies infrarouge (IR), UV-visible, la RMN ¹H, la RMN ¹³C afin de confirmer les structures déjà proposées.

Nous avons également envisagé des mesures de la conductivité molaire dans le DMF de toutes les structures afin d'évaluer leur aptitude à conduire l'électricité.

II.4.1. Conductivité molaire

Les résultats de conductivité molaire pour des solutions de concentration de 10⁻³ M dans le DMF des ligands et des complexes sont présentées dans les tableaux II.1 et II.2, respectivement. Les conductivités molaires des solutions fraîchement préparées sont comprises entre 1.5 et 8.89 Ω^{-1} .cm². mole⁻¹. Ces valeurs sont faibles. Elles montrent que les solutions des ligands bases de Schiff et de leurs complexes de zinc ne sont pas des électrolytes ³. Les solutions sont relativement neutres et les complexes sont stables en solution. La littérature a

montré qu'une conductivité est significative pour une structure quelconque en solution liquide si sa valeur serait supérieure à $75 \Omega^{-1} \text{ cm}^2 \text{ mole}^{-1}$ ⁴.

II.4.2. Analyse élémentaire

Les analyses élémentaires mesurées sur le carbone, l'hydrogène et l'azote (**CHN**) pour les structures sont en parfait accord avec les rapports centésimaux calculés. L'analyse élémentaire a montré que les rapports stœchiométriques ligand/métal des complexes sont mononucléaires de rapport 1:1.

Les résultats d'analyse élémentaire des ligands **H₂L²**, **H₂L⁵** et de leurs complexes **Zn(II)L²** et **Zn(II)L⁵**, respectivement, sont présentées dans le tableau II.3 ci-après:

Tableau II.3. Résultats de l'analyse élémentaire des ligands **H₂L²**, **H₂L⁵** et des complexes **Zn(II)L²** et **Zn(II)L⁵**.

Composé	%C	%H		%N
		Trouvé (calculé)		
H ₂ L ²	75.58 (75.90)	5.42 (5.19)	9.08 (8.93)	
H ₂ L ⁵	71.47 (71.62)	5.93 (5.91)	10.44 (10.51)	
Zn(II)L ²	60.28 (60.51)	4.22 (4.05)	7.17 (7.13)	
Zn(II)L ⁵	54.85 (54.91)	4.73 (4.67)	8.15 (8.09)	

II.4.3. Spectroscopie infrarouge (IR)

Les spectres infrarouges des cinq bases de Schiff et les complexes de zinc ont été réalisés à l'état solide, sous forme de pastilles de KBr, entre 400 et 4000 cm^{-1} .

Les vibrations de valence (stretchings) des groupements hydroxyle (**O-H**) et des groupements thiol (**S-H**) sont observées dans l'intervalle 3000-3500 cm^{-1} soit pour les ligands ou pour leurs complexes correspondants dans le spectre électromagnétique ⁵.

Dans le cas des ligands **H₂L**, les bandes sont larges à cause des interactions intramoléculaires entre l'hydrogène de l'hydroxyle ou de soufre et de l'azote (**OH---N** ou **SH---N**). Par contre, dans le cas des complexes **Zn(II)L**, cette bande exprime la présence d'eau superficielle absorbée par ces derniers. Il faut noter que les complexes bases de Schiff sont des structures à caractère hygroscopique. Selon la littérature, cette bande est pratiquement observable dans tous les complexes de cette classe ⁶.

En effet, les fréquences de la vibration de valence des doubles liaisons imine ou azométhine ($C=N$) sont au voisinage de 1600 cm^{-1} ^{7, 8}. D'autres absorptions mériteraient d'être évoquées dont :

- Une bande de moyenne intensité, située entre 1449 et 1609 cm^{-1} , caractérisant les vibrations dans le plan des squelettes $C=C$ dans les noyaux aromatiques.
- Une bande unique relativement intense, à environ $744-758\text{ cm}^{-1}$, reflétant les vibrations des quatre groupements $C-H$ adjacents dans les mêmes noyaux aromatiques.
- Les vibrations de valence des liaisons $C-H$ aliphatiques du groupement éthyle dans les composés H_2L^4 et H_2L^5 sont caractérisées par des bandes situées dans la région $2886-2974\text{ cm}^{-1}$.
- Des bandes d'absorption des groupements ($C-O$) et ($C-S$) sont observées dans la région $1100-1341\text{ cm}^{-1}$ ^{9, 10}.

Dans le cas des complexes, où le métal de transition zinc forment des chélates par coordination avec les deux hétéroatomes de type tétradentates N_2O_2 ou N_2S_2 , un déplacement bathochrome des bandes de vibration d'élongation des liaisons azométhine $C=N$ et un déplacement hypsochrome des bandes de vibration d'élongation de $C-O$ et de $C-S$ par rapport aux ligands sont observés^{11, 12}. Ces déplacements s'expliquent par la fragilisation de la bande $C=N$, par la diminution de sa constante de raideur et le renforcement de cette constante pour la bande $C-O$ ou $C-S$ qui reçoit une densité électronique supplémentaire à travers le métal ce qui explique la métallation des ligands par les complexes.

Egalement, une bande aux alentours de 1560 cm^{-1} est à relever pour les ligands et les complexes, elle constitue la vibration de valence des doubles liaisons $C=C$ du squelette hydrocarboné¹³.

La formation de la liaison métal-ligand est confirmée par l'apparition de nouvelles bandes dans les régions de 580 à 684 et 420 à 544 cm^{-1} dans les spectres des complexes métalliques qui sont attribués à $\nu(M-O)$ et $\nu(M-N)$, respectivement^{14, 15}. Ces bandes sont absentes dans les spectres des ligands.

Le tableau II.4 présente les bandes les plus significatives caractérisant nos composés synthétisés.

Tableau II.4. Principales bandes de vibration en IR des ligands H₂L¹-H₂L⁵ et leurs complexes Zn(II)L¹- Zn(II)L⁵.

Composé	Infra rouge ν (cm ⁻¹)					
	ν O-H/ ν S-H	ν C=N	ν C=C	ν C-O/ ν C-S	ν M—N	ν M—O
H ₂ L ¹	3443	1639	1609	1319	-	-
H ₂ L ²	(3500-3300)					
	3459	1624	1607	1282	-	-
H ₂ L ³	(3550-3400)					
	3447	1639	1545	1300	-	-
H ₂ L ⁴	(3550-3400)					
	3446	1640	-	1100	-	-
H ₂ L ⁵	(3500-3400)					
	3444	1636	1574	1290	-	-
Zn(II)L ¹	(3500-3450)					
	3438	1624	1544	1217	518	671
Zn(II)L ²	(3550-3480)					
	3430	1610	1536	1305	522	665
Zn(II)L ³	(3500-3300)					
	3200	1624	1529	1228	540	680
Zn(II)L ⁴	(3550-3450)					
	3446	1594	-	1120	515	682
Zn(II)L ⁵	(3500-3450)					
	3446	1638	1479	1348	547	613

Les spectres infrarouge des ligands **H₂L** et de leurs complexes de zinc **Zn(II)L** obtenus sont représentés dans l'annexe (figures 1 à 10).

II.4.4. Analyse par UV/Vis

Pour tous les composés, les bandes d'absorption sont données dans le tableau II.5 ci-après. Nous remarquons tout de même la concordance entre les résultats UV-Vis avec ceux de l'IR. Les spectres électroniques donnent une confirmation supplémentaire quant aux modes de coordination de métal avec les atomes **NNOO** ou **NNSS** et cela pour tous les complexes.

Un déplacement bathochrome est observé pour les complexes par rapport à leurs ligands dans le solvant DMF. Les bandes, se situant au voisinage de 280 nm pour les complexes sont attribuables aux transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ des chromophores azométhine (**C=N**)¹⁶.

Les bandes apparaissant entre 300 et 360 nm, sont associées aux phénomènes de transfert de charge ligand-métal (**LMCT**)¹⁷. Ces bandes sont dues aux transitions π (imine) \rightarrow métal¹⁸.

D'autres bandes, sous forme d'épaulements, sont observées dans les spectres des complexes aux environs de 400 à 480 nm. Elles sont dues aux transitions $d \rightarrow \pi^*$ ¹⁹, lesquelles sont liées aux phénomènes de transfert de charge entre le ligand et le métal.

Ces remarques corroborent de manière significative à la formation de liaisons de coordination entre le métal et le ligand pour tous les complexes.

Cette coordination induit une importante délocalisation électronique par conjugaison à travers les différents systèmes d'hybridation sp^2 constituant la molécule du complexe.

Tableau II.5. Bandes d'absorption en UV-Vis des ligands $H_2L^2 - H_2L^5$ et de leurs complexes $Zn(II)L^2 - Zn(II)L^5$.

Composé	UV/Vis		
	λ_{max} (nm) [ϵ] ($l \cdot mol^{-1} cm^{-1}$)		
H_2L^2	277 [26.6 x 10 ⁶],	336 [33 x 10 ⁶]	
H_2L^3	280 [94 x 10 ⁵],	398 [86.3 x 10 ⁵]	
H_2L^4	250 [51.2 x 10 ⁵]		
H_2L^5	320 [63.4 x 10 ⁴]		
$Zn(II)L^2$	309 [18.4 x 10 ³],	420 [27.5 x 10 ²],	464 [18.4 x 10 ³]
$Zn(II)L^3$	258 [12.5 x 10 ⁵],	283 [40.2 x 10 ⁴],	344 [17.2 x 10 ⁴]
$Zn(II)L^4$	258 [86.6 x 10 ⁴],	282 [19.1 x 10 ⁴]	
$Zn(II)L^5$	358 [3.5 x 10 ⁶]		

Les spectres des ligands $H_2L^2 - H_2L^5$ et des complexes $Zn(II)L^2 - Zn(II)L^5$ montrant les maximums d'absorption en UV-Vis, sont représentés dans l'annexe (figure 11).

II.4.5. Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Les spectres RMN en solution ont été enregistrés sur un spectromètre **Bruker 400 MHz**. Les déplacements chimiques sont rapportés en ppm et tous les spectres ont été obtenus dans chloroforme deutéré ($CDCl_3$).

II.4.5.1. RMN ¹H

Tous les ligands et leurs complexes présentent une symétrie selon laquelle seules les demi-résonances sont observées sur les spectres.

- H_2L^2 : RMN ¹H ($CDCl_3$, δ ppm) : 13.05 (s, 2H, OH), 8.59 (s, 1H, N=CH), 6.89-7.33, (m, Ar-H).
- H_2L^3 : RMN ¹H ($CDCl_3$, δ ppm) : 8.25 (s, 1H, SH), 7.53-7.10 (m, 4H, Ar-H), 2.11 (s, 3H, CH₃).

- H_2L^4 : RMN ^1H (CDCl_3 , δ ppm) : 6.3 (s, 1H, **SH**), 3.26 (m, 4H, **CH₂-N=C**), 2.00 (s, 3H, **CH₃**), 1.5 (m, 5H, **CH₂-CH₂-N**).
- H_2L^5 : RMN ^1H (CDCl_3 , δ ppm) : 13.20 (s, **OH**), 3.90 (s, **2H**), 6.84-8.33 (m, **Ar-H**).
- Zn(II)L^2 : RMN ^1H (CDCl_3 , δ ppm) : 8.3 (s, 1H, **N=CH**), 7.1 (s, **CH₂**, **4H**), 6.8–7.7 (m, **Ar-H**).
- Zn(II)L^3 : RMN ^1H (CDCl_3 , δ ppm) : 7.01-7.41 (m, 4H, **Ar-H**), 1.54 (s, 3H, **CH₃**).
- Zn(II)L^4 : RMN ^1H (CDCl_3 , δ ppm) : 7.24 (s, 4H, **CH₂-N=C**), 3.80 (s, 3H, **CH₃**), 1.56 (m, 5H, **CH₂-CH₂-N**).
- Zn(II)L^5 : RMN ^1H (CDCl_3 , δ ppm) : 7.24 (s, 1H imine), 3.4 (s, **CH₂**, **4H**), 7.4-8.1 (m, **Ar-H**).

Les spectres RMN ^1H de deux ligands H_2L^3 et H_2L^4 dans CDCl_3 ont montré que les protons aromatiques étaient des multiplets dans la plage de 7,53 à 7,10 ppm dans le ligand H_2L^3 . Les deux protons **SH** des ligands H_2L^3 et H_2L^4 apparaissent sous la forme d'ensembles de singulets pointus à 8,25 et 6,3 ppm, respectivement. Les déplacements chimiques obtenus pour les atomes d'hydrogène des groupes méthyle sont assez faibles. Toutes les valeurs sont ≤ 3 ppm²⁰, $\delta = 2.11$ et $\delta = 2$ ppm correspondant aux protons méthyliques (CH_3) pour H_2L^3 et H_2L^4 , respectivement, (figures 12 et 13, partie annexe).

En ce qui concerne les spectres des complexes de zinc diamagnétiques, on observe la déprotonation des groupements thiols des deux ligands. Les anions soufrés ainsi formés forment des liaisons de coordination avec l'ion métallique bivalent. Ce phénomène est certainement lié à la rigidité des structures qui sont constituées d'un squelette sp^2 coplanaire ainsi que du plan carré généralement observé pour les complexes de zinc. Toutes ces observations constituent encore une confirmation supplémentaire de la métallation des ligands.

Tous les protons aromatiques des ligands et des complexes résonnent sous forme d'un massif entre **6.60** et **8.80 ppm**²¹. Les courbes intégrales sont quasiment en accord avec le nombre de protons dans chaque structure, ce qui confirme bien entendu les structures proposées des composés synthétisés (figure 14 et 15, partie annexe).

II.4.5.2. RMN ^{13}C

Les valeurs des déplacements ci-dessous montrent les pics spécifiques attribués aux carbones présents dans la structure moléculaire de ces composés.

- **H₂L³**: RMN ^{13}C (CDCl₃, δ ppm) : 125.20 (**C1**, CH=CH-CH), 126.16 (**C2**, CH-CH=CH), 130.25 (**C3**, CH=CH-N), 169,41 (**C4**, N=C-), 23.81 (**C5**, N=C-CH₃).
- **H₂L⁴**: RMN ^{13}C (CDCl₃, δ ppm) : 170.61 (**C3**, C=N), 35.82 (**C2**, CH₂-N=C), 30.06 (**C1**, CH₂-CH₂-N), 23.33 (**C4**, C-CH₃).

Pour les spectres RMN ^{13}C , le ligand **H₂L³**, les signaux C1, C2 et C3 (carbones benzéniques) sont observés respectivement à 125.200, 126.163 et 130.254 ppm, les signaux C5 de **H₂L³**, C1, C2 et C4 des signaux **H₂L⁴** (carbones méthylène) sont observés à 23.811, 30,060, 35,823 et 23,330 ppm, respectivement. La formation de la base de Schiff est supportée par la présence d'un pic correspondant C4 pour **H₂L³** et C3 pour **H₂L⁴** (carbone azométhine) à 169,411 et 170,612 ppm ²¹.

Les spectres RMN ^{13}C des ligands **H₂L³** et **H₂L⁴** enregistré dans le chloroforme deutéré (CDCl₃). sont présentés dans les figures 16 et 17, partie annexe.

II.5. Conclusion

Trois types de ligands bases de Schiff tétradentates aux ponts 2,3-diaminopyridine, aux ponts 1,2-diaminobenzene, aux pont 1,3-diaminopropyle et aux pont 1,2-diaminoéthyle et leurs complexes de zinc ont été synthétisés. La pureté des produits de synthèse est démontrée par les différentes techniques spectroscopiques. l'analyse élémentaire, les analyses spectrales IR, UV/Vis, RMN du proton et du carbone 13 ont permis de caractériser et d'identifier toutes les structures. L'interprétation des différents spectres de nos ligands bases de Schiff et leurs complexes de zinc est conforme aux structures proposées.

Compte tenu des résultats précédents et malheureusement en raison de la non solubilité du ligand **H₂L¹** et son complexe **Zn(II)L¹** et la solubilité des autres ligands **H₂L²**, **H₂L³**, **H₂L⁴** et **H₂L⁵** et leurs complexes de zinc dans certains solvants, nous avons choisi d'étudiés juste ces derniers composés dans la suite de ce travail, notamment dans le Chapitre IV, où on a évalué expérimentalement l'activité antienzymatique et l'activité antibactérienne de ces composés choisis.

References bibliographiques

1. A. Ourari, K. Ouari, W. Moumeni, L. Sibous, G. Bouet, M. Khan, Unsymmetrical Tetradentate Schiff Base Complexes Derived from 2,3-diaminophenol and Salicylaldehyde or 5-bromosalicylaldehyde, *Transition Met. Chem.* **31** (2006) 169-175.
2. Y-Y. Liu, J-F. Ma, J. Yang, Z-M. Su, Synthesis and Characterization of Six Coordination Polymers of Zinc(II) and Cobalt(II) with 1, 3,5-Benzenetricarboxylate Anion and Bis(imidazole) Ligands, *Inorg. Chem.* **46** (2007) 3027–3037.
3. R. Natarajan, P. Narayanaperumal, Lasing the DNA fragments through β -diketimine framed Knoevenagel condensed Cu(II) and Zn(II) complexes-An *in vitro* and *in vivo* approach, *Spectrochimica Acta Part A*, **118** (2014) 867–882.
4. A.A. Osowole, Syntheses and Characterization of Some Tetradentate Schiff-Base Complexes and Their Heteroleptic Analogues, *E-Journal of Chemistry*, **5** (2008) 130-135.
5. I. Sheikhsaie, V. Saheb, A new salen base 5-(phenylazo)-N-(2-amino pyridine) salicyliden Schiff base ligand: Synthesis, experimental and density functional studies on its crystal structure, FTIR, ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra, *Spectrochimica Acta Part A*, **77** (2010) 1069–1076.
6. I.V. Korendovych, E.V. Rybak-Akimova, Complexes of benzo-15-crown-5 with protonated primary amines and diamines, *Acta. Cryst. C*, **60** (2004) 82-84.
7. V. Reddy, N. Patil, S. D. Angadi, Synthesis, characterization and antimicrobial activity of Cu (II), Co (II) and Ni (II) complexes with O, N, and S donor ligands, *E-J. Chem.* **5** (2008) 577.
8. K. Nakamoto, Infrard Spectra of inorganic and coordination Compounds, John Wiley, New York, (1970).
9. P. Talukder, S.S.S. Mitra, L. Dahlenberg, C Desplanches, J.P. Sutter, Evidence for Hydrogen-Bond-Mediated Exchange Coupling in an AquaBridged CuII Dimer: Synthesis, Magnetic Study and Correlation with Density Functional Calculations, *Eur J Inorg Chem.* **329** (2006) 329-333.
10. N. Padma Priya, S. Arunachalam, A. Manimaran, D. Muthupriya, C. Jayabalakrishnan, Mononuclear Ru (III) Schiff base complexes: Synthesis, spectral, redox, catalytic and biological activity studies, *Spectrochim. Acta Part A*, **72** (2009) 670-676.
11. A.A. Osowole, G.A. Kolawole, O.E. Fagade, Synthesis, physicochemical, and biological properties of nickel (II), copper (II), and zinc (II) complexes of an unsymmetrical tetradentate Schiff base and their adducts, *Inorg. Met. Org. Chem.* **35** (2005) 829-836.
12. M.M. Abd-Elzar, Spectroscopic characterization of some tetradentate Schiff bases and their complexes with nickel, copper and zinc, *J. Chin. Chem. Soc.* **48** (2001) 153-158.

13. R. Karvembu, K. Natarajan, Synthetic, catalytic and biological studies of new binuclear ruthenium (II) complexes containing thiobis (β -diketones) and triphenylphosphine, *Polyhedron*, **21** (2002) 1721-1727.
14. S.F. Hung, X.H. Liang, H.C. Fang, X.L. Zhan, Z.Y. Zhou, L. Chen, Y.P. Cai, Synthesis and characterization of zinc (II) and cobalt (III) Schiff base complexes, *Transition Met Chem.* **34** (2009) 115–120.
15. P.M. Alex, K. K. Aravindakshan, Synthesis, Characterization and Thermal Decomposition Studies of Cr(III), Mn(II) and Fe(III) Complexes of N, N'-Bis[1,3-benzodioxol-5-ylmethylene]butane-1,4-diamine, *E.J. of Chem.* **6** (2009) 449-458.
16. M.R. Maurya, A. Kumar, Oxovanadium (IV) based coordination polymers and their catalytic potentials for the oxidation of styrene, cyclohexene and trans-stilbene, *J. Mol. Catal. A: Chem.* **250** (2006) 190-198.
17. M. Tumer, Synthesis and spectral characterization of metal complexes containing tetra- and pentadentate Schiff base ligands, *Inorg. Met. Org. Chem.* **30** (2000) 1139-1158.
18. G. Abolfazl, B. Mahdi, D. Grzegorz, K. Maciej, S. Mehdi, Crystal structure, electrochemistry, and catalytic studies of a series of new oxidovanadium (IV) Schiff-base complexes derived from 1, 2-diphenyl-1, 2-ethylenediamine, *J. of Coordination Chem.* **65** (2012) 840–855.
19. M. Asadi, Z Asadi, N. Savaripoor, M. Dusek, V. Eigner, M. Ranjkesh Shorkaei, M. Sedaghat, Structural investigation of oxovanadium (IV) Schiff base complexes: X-ray crystallography, electrochemistry and kinetic of thermal decomposition, *Spectrochimica Acta Part A*, **136** (2015) 625–634.
20. F.A. Cotton, C.W. Wilkinson, *Advanced Inorganic Chemistry*, 3rd ed., Interscience publisher, New York, (1972) 431.
21. G. Bratulescu, *Introduction in Organic Compounds Spectroscopy*, Sitech, Graiova, Romania, (2009).

CHAPITRE III

Etude théorique des ligands bases de Schiff synthétisés

Les ligands bases de Schiff ont été utilisés dans le domaine de la biologie comme des inhibiteurs. Ceci est possible, grâce à la combinaison de deux facteurs ; la flexibilité du ligand et la disponibilité des paires d'électrons libres sur les atomes du soufre ou d'oxygène.

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à l'étude théorique des ligands bases de Schiff tétradentates synthétisés **H₂L** de type NNOO ou NNSS. Des calculs utilisant la DFT (Density Functional Theory), permet de prédire la stabilité et la réactivité chimique de ses composés. Nous avons commencé par un petit rappel bibliographique sur la modélisation moléculaire et la méthode utilisée dans notre étude (DFT), ensuite, nous les appliquons sur nos molécules synthétisées.

III.1. Modélisation moléculaire

La chimie assistée par ordinateur («Computational Chemistry» en anglais) est le domaine de la chimie qui fait intervenir l'ordinateur, ses applications peuvent être de différente nature, telles que l'élucidation et l'analyse de structures chimiques, le traitement d'informations chimiques ou encore la chimie théorique ¹. Les domaines de la chimie théorique sont, de même, très nombreux : chimie quantique, mécanique moléculaire, dynamique moléculaire ou encore représentation moléculaire.

L'utilisation de méthodes théoriques pour l'obtention de modèles qui puissent prédire et comprendre les structures, les propriétés et les interactions moléculaires est connue sous le nom de « Modélisation Moléculaire ». Celle-ci permet de fournir des informations qui ne sont pas disponibles par l'expérience et joue donc un rôle complémentaire à celui de la chimie expérimentale. Ainsi, la modélisation moléculaire peut par exemple permettre de se faire une idée précise de la structure de l'état de transition pour une réaction donnée, ce qui est difficile, voire impossible, pour la chimie expérimentale.

Il existe une multiplicité de méthodes (Figure III.1), contenant plus ou moins d'approximations, ayant pour but de décrire les interactions entre atomes.

Les méthodes de chimie quantique peuvent être classées sur la base du traitement des intégrales de répulsion interélectronique : méthodes dites « **ab initio** » (c'est-à-dire basées sur les premiers principes, non empiriques), et méthodes semi empiriques. Dans les méthodes *ab initio* les intégrales sont évaluées rigoureusement et tous les électrons sont, en principe, pris en compte. Dans la seconde catégorie de méthodes, une grande partie de ces intégrales est négligée, simplifiée ou approchée en corrélant les résultats à des données expérimentales. De plus, certains des électrons ne sont pas explicitement pris en considération et généralement

seuls les électrons de valence, ou même les électrons π (méthodes de Hückel), sont impliqués dans ce type de calculs.

Une seconde classification possible se fonde sur le traitement de la corrélation électronique. La méthode Hartree Fock « **HF** » non corrélée peut être améliorée par des traitements appelés post-Hartree Fock comme l'interaction de configuration (CI), la multiconfiguration SCF (MC-SCF), la théorie de perturbation Many-Body (MBPT) et la méthode Coupled-Cluster (CC). De plus, une alternative de choix pour l'ajout de la corrélation électronique est l'utilisation de méthodes basées sur la théorie de la fonctionnelle de la densité ².

Les méthodes citées ci-dessus constituent une première approche du traitement de la corrélation électronique. La théorie de la fonctionnelle de la densité propose quant à elle une approche totalement différente du traitement de la corrélation électronique. La méthode de DFT a acquis une popularité grandissante dans les dernières années, et elle constitue une alternative de choix aux méthodes ab initio présentées précédemment. Les théorèmes de Hohenberg et Kohn sont à la base de méthode de **DFT** ³. Celles-ci utilisent la densité électronique au lieu de la fonction d'onde à n électrons comme variable du système ce qui permet de traiter les systèmes de grande taille.

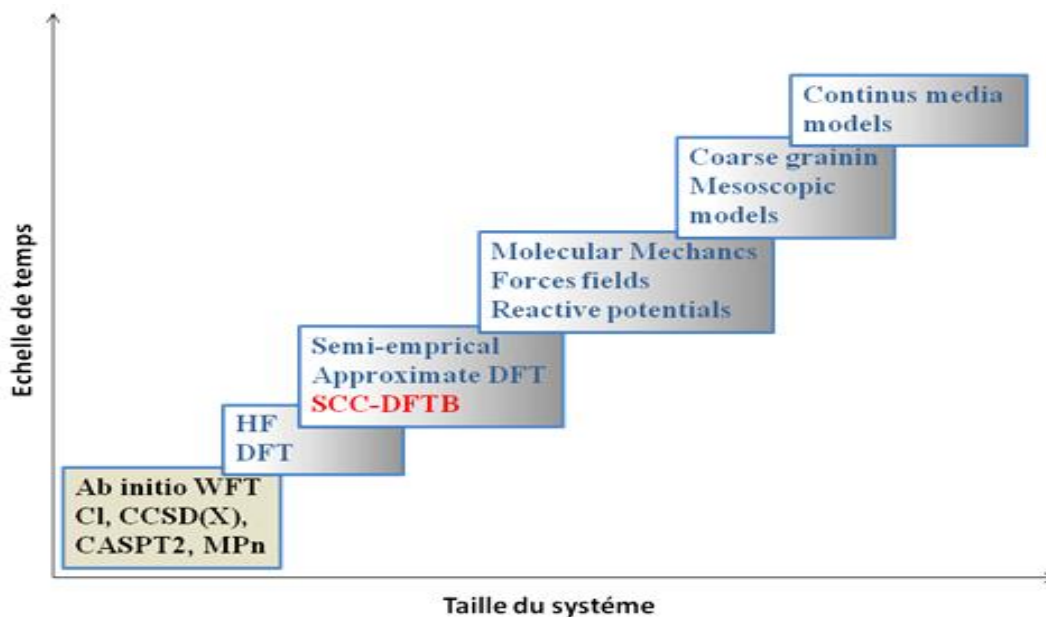


Figure III.1. Schéma d'ensemble des différentes méthodes de la modélisation moléculaire.

III.2. Descripteurs moléculaires et types

Un descripteur moléculaire est un paramètre (une valeur numérique) propre à une structure chimique donnée, et calculé à partir de la structure elle même. Les descripteurs calculés, permettent d'effectuer des prédictions sans avoir à synthétiser les molécules, ce qui est l'un des objectifs de la modélisation moléculaire. Les descripteurs moléculaires jouent un rôle fondamental dans les études de la relation structure activité/propriété. Ils sont utilisés en tant que variables indépendantes pour prédire une variable dépendante (activité ou propriété).

Dans ce qui suit, nous allons présenter uniquement les descripteurs moléculaires les plus utilisés dans notre travail, en commençant par les descripteurs les plus simples, qui nécessitent peu de connaissances sur la structure moléculaire. Nous verrons ensuite comment les progrès de la modélisation moléculaire ont permis d'accéder à la structure 3D de la molécule, et de calculer des descripteurs à partir de cette structure.

III.2.1. Descripteurs géométriques

Ces descripteurs peuvent être obtenus par modélisation moléculaire, empirique ou ab-initio. Ils sont basés sur l'arrangement spatial des atomes constituant la molécule et sont définis par les coordonnées des noyaux atomiques et la grosseur de la molécule représentée.

Ces descripteurs incluent des informations sur la surface moléculaire obtenue par les aires de Van Der Waals et leur superposition ⁴. Les volumes moléculaires peuvent être obtenus par les volumes de Van Der Waals. Parmi ceux on trouve :

- **Le volume moléculaire**, noté **MV**, en **cm³**, est défini par la formule suivante :

$$MV = MW/d \quad \dots\dots\dots (1)$$

Avec : MW est le poids moléculaire et d la densité.

- **La surface de Van Der Waals**, noté **SVDW**, est décrite comme résultant de l'ensemble des surfaces atomiques définies par le rayon de Van Der Waals de chaque atome composant la molécule. Plus cette surface est grande et plus importantes sont les possibilités d'interactions.

III.2.2. Descripteurs physico-chimiques

Les descripteurs physicochimiques, (ou indices physicochimiques) certains d'entre eux reflètent la composition moléculaire du composé (le nombre et le type d'atomes et de liaisons présents dans la molécule, le nombre de cycle, les propriétés donneur/accepteur de liaison H,

cation, anion, etc....) ⁵. D'autres représentent le caractère hydrophile ou lipophile de la molécule. Parmi ceux que nous avons utilisés dans notre travail, on trouve :

- **Charge atomique Mulliken** : Le calcul de charge atomique Mulliken à un rôle important dans l'application du calcul de la chimie quantique au système moléculaire car les charges atomiques agissent sur le moment dipolaire, la polarisabilité moléculaire, la structure électronique et plus encore sur les propriétés des systèmes moléculaires ⁶. Les distributions de charge sur les atomes suggèrent la formation de paires de donneurs et d'accepteurs impliquant le transfert de charge dans la molécule.

- **Le potentiel électrostatique moléculaire** : noté (**MEP**), fournit une méthode visuelle pour comprendre la polarité relative d'une molécule, le potentiel électrostatique (électrons + noyaux) ⁷ et pour trouver les sites réactifs des molécules ⁸. Les cartes de potentiel électrostatique illustrent les distributions de charge des molécules en trois dimensions.

- **La polarisabilité** : notée $\langle \alpha \rangle$ est l'aptitude à la déformation du nuage électronique de la molécule sous l'influence d'un champ électrique uniforme. C'est l'un des paramètres qui traduisent les propriétés moléculaires liées à l'hydrophobie et par conséquent aux activités biologiques ⁹⁻¹¹. Elle est calculée comme suit :

$$\langle \alpha \rangle = 1/3 (\alpha_{xx} + \alpha_{yy} + \alpha_{zz}) \dots\dots\dots (2)$$

- **L'anisotropie de polarisabilité ($\Delta\alpha$) et l'hyperpolarisabilité (β_{tot})** : Elles caractérisent les propriétés optiques non linéaires (NLO) du système dans un champ électrique appliqué ¹². Afin d'étudier les relations entre la génération de photocourant, la structure moléculaire et les propriétés optiques non linéaires. Les équations complètes pour calculer l'amplitude de l'anisotropie de la polarisabilité et la première hyperpolarisabilité moyenne utilisent les composantes x, y et z sont comme suit :

$$\Delta\alpha = 1/\sqrt{2} [(\alpha_{xx} - \alpha_{yy})^2 + (\alpha_{xx} - \alpha_{zz})^2 + (\alpha_{yy} - \alpha_{zz})^2 + 6\alpha_{xy}^2 + 6\alpha_{xz}^2 + 6\alpha_{yz}^2]^{1/2} \dots\dots\dots (3)$$

$$\beta_{tot} = [(\beta_{xxx} + \beta_{yyy} + \beta_{zzz})^2 + (\beta_{yyy} + \beta_{yzz} + \beta_{yxx})^2 + (\beta_{zzz} + \beta_{zxx} + \beta_{zyy})^2]^{1/2} \dots\dots\dots (4)$$

- **La densité** : notée (**d**) en (kg/m³), est liée à la masse et la taille de la molécule. C'est le rapport du poids moléculaire MW au volume moléculaire MV

III.2.3. Descripteurs quantiques / électroniques

Ces descripteurs caractérisent la distribution de charge des molécules (polarité des molécules) mais aussi les paramètres de la chimie quantique qui, pour être calculés de manière fiable, nécessitent des calculs plus sophistiqués. Les approches de la chimie quantique nous donnent accès à des informations supplémentaires telles que des données structurales, énergétiques, électroniques et spectroscopiques des systèmes étudiés ¹³.

Parmi ces propriétés, que nous avons utilisées dans nos travaux, on trouve :

- **L'énergie totale** : Pour une molécule isolée à l'état fondamental, l'énergie totale calculée, notée **Et**, mesurée en **a.u.**, peut être utilisée comme descripteur moléculaire quantique. Cette énergie approximative a été calculée pour une conformation optimisée de la géométrie la plus stable dont la structure d'énergie est minimale.

- **L'électronégativité** : notée (χ), mesurée en **a.u.**, est la tendance d'un atome ou d'un groupe fonctionnel à attirer des électrons vers lui. Plus l'électronégativité associée est élevée, plus un élément ou un composé attire les électrons. L'électronégativité (χ) est définie par Parr et Mulliken ^{14, 15} selon l'équation 5.

$$\chi = - (E_{HOMO} + E_{LUMO}) / 2 \quad \dots\dots\dots (5)$$

- **Le potentiel chimique électronique** : noté (μ), mesuré en **a.u.** est le négatif de l'électronégativité d'une molécule et déterminé en utilisant l'équation :

$$\mu = (E_{LUMO} + E_{HOMO}) / 2 \quad \dots\dots\dots (6)$$

- **Les énergies des orbitales frontières** : Elles jouent un rôle majeur dans de nombreuses réactions chimiques et dans les mécanismes réactionnels. Les énergies de ces orbitales sont des paramètres très populaires dans la chimie quantique ^{16, 17} : L'énergie **HOMO**, notée **E_{HOMO}**, mesurée en **a.u.**, est le niveau d'énergie le plus élevé dans la molécule qui contient des électrons. Elle est directement liée au potentiel d'ionisation. Lorsqu'une molécule agit comme une base de Lewis (un doublet d'électrons donneur) dans la formation d'une liaison, les électrons sont alimentés à partir de cette orbite. Ils mesurent la nucléophilie d'une molécule et caractérisent la susceptibilité de la molécule à l'attaque par des électrophiles ¹⁸. L'énergie **LUMO**, notée **E_{LUMO}**, mesurée en **a.u.**, est le niveau d'énergie le plus bas dans la molécule qui ne contient pas d'électrons. Elle est directement liée à l'affinité d'électron. Lorsqu'une molécule agit comme un acide de Lewis (un doublet d'électrons accepteur) dans la formation

de liaisons, des doublets d'électrons entrants sont reçus dans cette orbite. Ils mesurent l'électrophilicité d'une molécule et caractérise la susceptibilité de la molécule à l'attaque par les nucléophiles ¹⁹.

- **Le Gap énergétique**, ou l'écart **HOMO-LUMO**, noté **E_{gap}**, mesuré en **a.u**, traduit l'énergie comprise entre l'orbitale moléculaire la plus haute occupée et la plus basse vacante. C'est un indice de stabilité important. Cette différence d'énergie sert de mesure de l'excitabilité d'une molécule. Ainsi, plus l'intervalle d'énergie sera faible et plus la molécule pourra interagir. Un grand écart **HOMO-LUMO** implique une grande stabilité pour la molécule dans le sens de sa faible réactivité dans les réactions chimiques, et de même, un faible écart implique une grande réactivité de la molécule ²⁰. L'écart **HOMO-LUMO** à également été utilisé comme une approximation de la plus faible énergie d'excitation de la molécule ²¹.

- **La dureté chimique** : notée (**η**) détermine la résistance au changement de la distribution électronique. Il est associé à la stabilité et à la réactivité d'un système chimique et peuvent être obtenues à partir de la première dérivée du potentiel chimique ^{22,23} selon l'équation 7.

$$\eta = (\partial \mu / \partial N)_{v(r)} = 1/2 (E_{LUMO} - E_{HOMO}) / 2 \quad \dots\dots\dots (7)$$

- **La mollesse** : notée (**S**) est la propriété d'une molécule qui aide au calcul de la réactivité chimique. C'est l'inverse de la dureté et calculé selon l'équation 8 ²⁴.

$$S = 1/2\eta \quad \dots\dots\dots (8)$$

- **L'indice d'électrophilicité** : notée (**ω**), utilisée pour caractériser la capacité d'une molécule à engendrer un transfert d'électron. C'est la mesure de la stabilisation de l'énergie après qu'un système accepte une quantité supplémentaire de charge électronique provenant de l'environnement, elle est calculée selon la formule suivante ²⁴ :

$$\omega = \mu^2/2\eta \quad \dots\dots\dots (9)$$

- **Le moment dipolaire** : noté (**μ_{tot}**) : est une propriété importante, principalement utilisé pour étudier les interactions intermoléculaires telles que les forces de dipôle-dipôle de type de van der Waals etc., car plus le moment dipolaire est élevé, plus les interactions intermoléculaires seront fortes. Le moment dipolaire total dans une trame Cartésienne est défini par ²⁵ :

$$\mu_{tot} = (\mu_x^2 + \mu_y^2 + \mu_z^2)^{1/2} \dots\dots\dots (10)$$

Dans le cadre de ce travail, nous avons choisi la théorie de la fonctionnelle de la densité (**DFT**) qui est un bon compromis entre la précision et le temps de calcul et le logiciel Gaussian.

- **Théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT)**

La théorie de la Fonctionnelle de la Densité (que l'on appellera en anglais Density Functional Theory) est devenue, au fil des dernières décennies, un outil théorique qui a pris une place très importante parmi les méthodes utilisées pour la description et l'analyse des propriétés physiques et chimiques pour les systèmes complexes, particulièrement pour les systèmes contenant un grand nombre d'électrons ²⁶. La DFT est une reformulation du problème quantique à N corps et comme son nom l'indique, c'est une théorie qui utilise uniquement la densité électronique en tant que fonction fondamentale au lieu de la fonction d'onde comme le cas dans la méthode de Hartree et Hartree-Fock.

- **Le logiciel Gaussian**

Gaussian, le logiciel de chimie numérique d'étude et de modélisation moléculaire basé sur les lois fondamentales de la mécanique quantique, Gaussian nous permet de pronostiquer les énergies, les structures moléculaires et fréquences de vibration de systèmes moléculaires complexes, et d'anticiper leurs propriétés chimiques. Molécules et réactions peuvent être étudiées dans une gamme étendue de conditions non seulement pour des espèces stables ou des composés complexes mais également pour des composés impossibles à observer expérimentalement, comme des intermédiaires éphémères ou des états de transition.

Les calculs gaussiens sont mieux préparés en utilisant l'interface Gaussview. Gaussview nous permet de construire la molécule requise sur l'écran et d'utiliser le menu déroulant des menus nous pouvons charger le fichier dans le programme gaussien pour l'exécution. Après la course gaussienne a terminé, nous pouvons voir le fichier log complet écrit par Gaussian et nous aussi peut utiliser le binaire Fichier chk pour générer diverses surfaces graphiques.

III.3. Calculs de la chimie quantique

Tous les calculs de chimie quantique et la visualisation des résultats ont été effectués au niveau B3LYP (trois paramètres de Becke utilisant la fonction de corrélation de Lee-Yang-Parr) en utilisant la méthode de Berny^{27, 28} avec la base 6-31G (d, p) à l'état gazeux. Ce processus a été réalisé avec le logiciel Gaussian 09²⁹ et Gauss View visualisation 5.0.8³⁰. Aucune fréquence imaginaire n'a été obtenue lors des calculs de fréquence vibrationnelles, indiquant que toutes les structures étaient stables. Après optimisation, la charge atomique Mulliken, le potentiel électrostatique moléculaire (MEP), les propriétés des orbitales moléculaires de frontière (HOMO, LUMO), les propriétés optiques non-linéaires (NLO) et les propriétés thermodynamiques de **H₂L²**, **H₂L³**, **H₂L⁴** et **H₂L⁵** ont été analysés par la méthode B3LYP/6-31G (d, p).

III.3.1. Spectroscopie vibrationnelle

Les fréquences vibratoires harmoniques pour **H₂L²**, **H₂L³**, **H₂L⁴** et **H₂L⁵** ont été calculées par la DFT en utilisant la méthode 6-31G (d, p). Les fréquences correspondantes ainsi que les assignements et les intensités sont indiquées dans le tableau III.1, tandis que les spectres vibrationnels observés et calculés sont présentés sur la figure III.2.

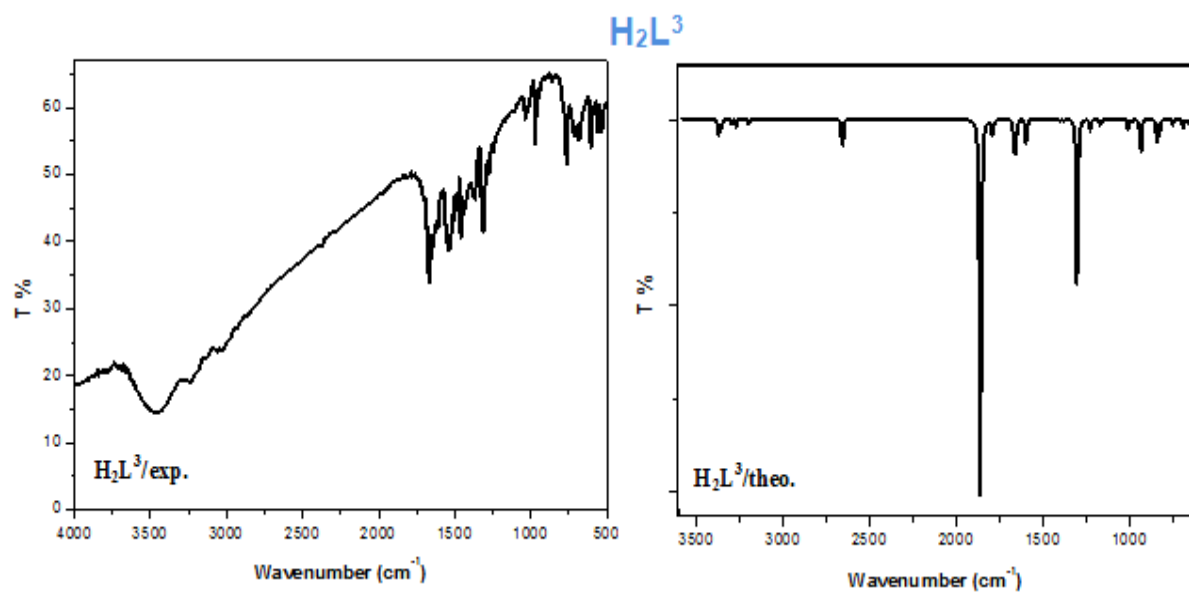
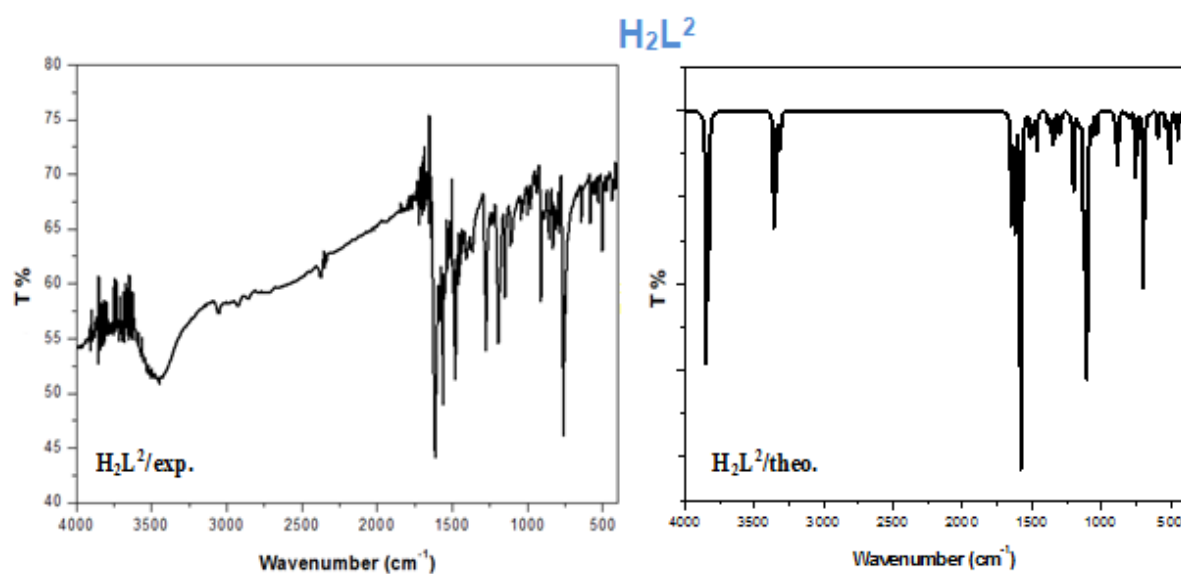
Dans les spectres IR, les composés **H₂L²**, **H₂L³**, **H₂L⁴** et **H₂L⁵** présentent une large bande d'absorption dans la région de 3300 à 3820 cm⁻¹, respectivement centré à 3450, 3430, 3300 et 3444 cm⁻¹, pouvant être affecté à une liaison hydrogène intramoléculaire résultant de la présence de groupes hydroxyles ou thiols dans leurs structures moléculaires. Tandis qu'ils ont été calculés à 3828, 3442, 3340 et 3819 cm⁻¹, respectivement. Les bandes C-N expérimentales dans **H₂L²**, **H₂L³**, **H₂L⁴** et **H₂L⁵** ont été observées sous forme de bandes fortes respectivement à 1399, 1313, 1300 et 1391 cm⁻¹, calculées à 1383, 1323, 1297 et 1300 cm⁻¹. La forte bande observée à 1624 cm⁻¹ pour **H₂L²**, à 1667 cm⁻¹ pour **H₂L³**, à 1639 cm⁻¹ pour **H₂L⁴** et à 1636 cm⁻¹ pour **H₂L⁵** pourrait être attribuée à la vibration d'étirement C = N^{31, 32} qui était en accord avec les nombres d'onde calculés à 1636, 1769, 1760 et 1648 cm⁻¹, respectivement.

Comme présenté dans le tableau III.1 et la figure III.2, on peut voir que les valeurs expérimentales ont une meilleure corrélation avec les valeurs de calcul. Confirmant ainsi les validités des structures optimisées de **H₂L²**, **H₂L³**, **H₂L⁴** et **H₂L⁵**.

Tableau III.1. Les principales fréquences de vibration et leurs assignements pour les composés H₂L², H₂L³, H₂L⁴ et H₂L⁵ calculées par la méthode B3LYP/6-31G (d, p).

H ₂ L ²			H ₂ L ³		
<u>ν_{exp} (cm⁻¹)</u>	<u>ν_{calc} (cm⁻¹)</u>	<u>Assignment</u>	<u>ν_{exp} (cm⁻¹)</u>	<u>ν_{calc} (cm⁻¹)</u>	<u>Assignment</u>
3450	3828	ν (OH)	3430	3442	ν (SH)
3100	3155	ν_{asym} (CH) aromatic	-	3055	ν_{asym} (CH) aromatic
2820	3130	ν_{sym} (CH) aromatic	3129	3130	ν_{sym} (CH) aromatic
2600	3056	ν_{sym} (CH) aromatic	3026	3056	ν_{sym} (CH) aromatic
1624	1636	ν (C=N)	1667	1769	ν (C=N)
1480	1575	ν_{asym} (C=C) aromatic	1462	1499	ν_{asym} (C=C) aromatic
1399	1383	ν (C-N)	1450	1454	δ_{sym} (CH ₃), δ_{sym} (CH ₂)
1192	1292	ν (C-C)	1313	1323	ν (C-N)
1108	1200	In-plane CH deformation mode ω (CH ₂)	1303	1263	ν (C-C)
856	868	out-of-plane CH deformation mode	1032	1030	In-plane CH deformation mode ω (CH ₂)
758	754	δ_{sym} (CCC)	864	866	out-of-plane CH deformation mode
637	645	δ (CNC)	695	701	δ_{sym} (CCC)
			614	609	δ (CNC)

H ₂ L ⁴			H ₂ L ⁵		
<u>ν_{exp} (cm⁻¹)</u>	<u>ν_{calc} (cm⁻¹)</u>	<u>Assignment</u>	<u>ν_{exp} (cm⁻¹)</u>	<u>ν_{calc} (cm⁻¹)</u>	<u>Assignment</u>
3300	3340	ν (SH)	3444	3819	ν (OH)
-	3223	ν_{asym} (CH) aliphatic	3180	3223	ν_{asym} (CH) aliphatic
3105	3099	ν_{sym} (CH) aliphatic	2800	3099	ν_{sym} (CH) aliphatic
2981	2962	ν_{asym} (CH) aliphatic	2445	2962	ν_{asym} (CH) aliphatic
2942	2953	ν_{sym} (CH ₃)	1636	1638	ν (C=N)
1639	1760	ν (C=N)	1391	1300	ν (C-N)
1442	1408	δ_{sym} (CH ₃), δ_{sym} (CH ₂)	1290	1207	ν (C-C)
1300	1297	ν (C-N)	1151	1153	In-plane CH deformation mode ω (CH ₂)
1217	1212	ν (C-C)	853	852	out-of-plane CH deformation mode
1126	1129	In-plane CH deformation mode ω (CH ₂)	744	740	δ_{sym} (CCC)
898	858	out-of-plane CH deformation mode	641	650	δ (CNC)
671	682	δ_{sym} (CCC)			
617	653	δ (CNC)			



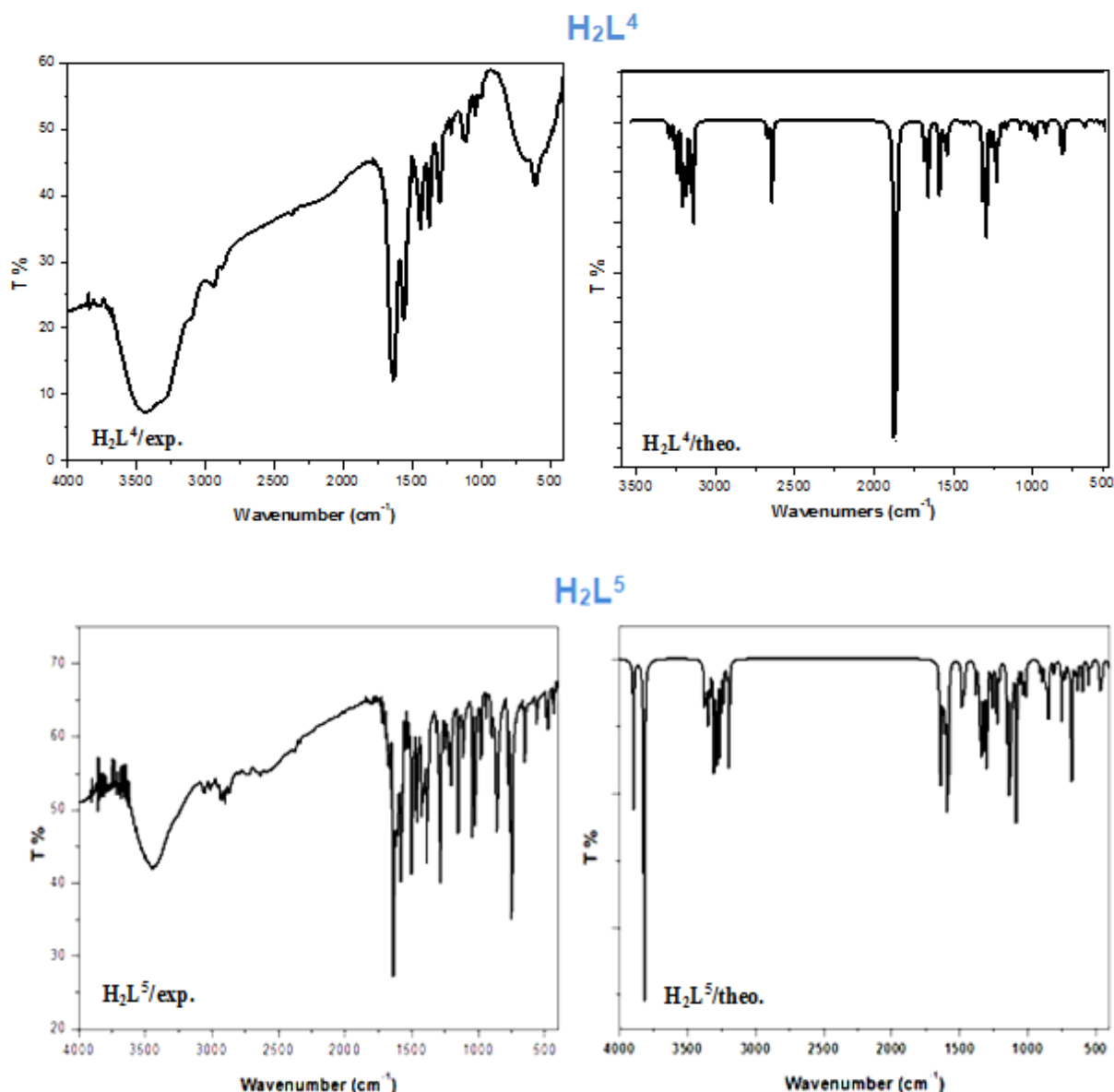


Figure III.2. Spectres FT-IR expérimentales et théoriques de H_2L^2 , H_2L^3 , H_2L^4 et H_2L^5 .

III.3.2. Spectres d'absorption électroniques

Les calculs TD-DFT avec les 6 premiers spin-permettent de déterminer les excitations singulet-singulet des ligands en phase gazeuse et sont réalisées en utilisant la méthode B3LYP-6-31G (d, p) pour mieux comprendre les spectres électroniques.

Les spectres expérimentaux et calculés des ligands bases de Schiff H_2L^2 , H_2L^3 , H_2L^4 et H_2L^5 sont donnés dans la figure III.3. L'état excités calculés, bandes d'absorption, force de l'oscillateur (f_{os}), orbitales de transition et leur énergie d'excitation sont rassemblés dans le tableau III.2.

L'affectation des bandes expérimentales aux transitions calculées est basée sur le critère de l'énergie et de force de l'oscillateur des transitions calculées. Les bandes d'absorption pour $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^2$, $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^3$, $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^4$ et $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^5$ sont apparues aux environ 336, 277 ; 398, 280 ; 250 et 320 nm, respectivement. Les bandes d'absorption d'énergie à 277 et 280 nm pour les ligands $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^2$, $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^3$ et $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^5$, respectivement, sont apportées par les excitations électroniques de HOMO-2 à LUMO à 277 nm avec force de l'oscillateur 0.1300 pour $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^2$ et de HOMO-1 à LUMO à 295 nm avec force de l'oscillateur 0,0772 pour $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^3$. Donc cette absorption peut être attribuée à $\pi \rightarrow \pi^*$ transition aromatique électronique. Les absorptions à 336 nm pour $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^2$, 398 nm pour $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^3$, 250 nm pour $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^4$ et 320 nm pour $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^5$ sont la contribution par les excitations électroniques de HOMO-1 à LUMO, HOMO à LUMO, HOMO-3 à LUMO et HOMO à LUMO, respectivement. Ces orbitales ont un caractère π , qui peut être attribué à $n \rightarrow \pi^*$ transitions.

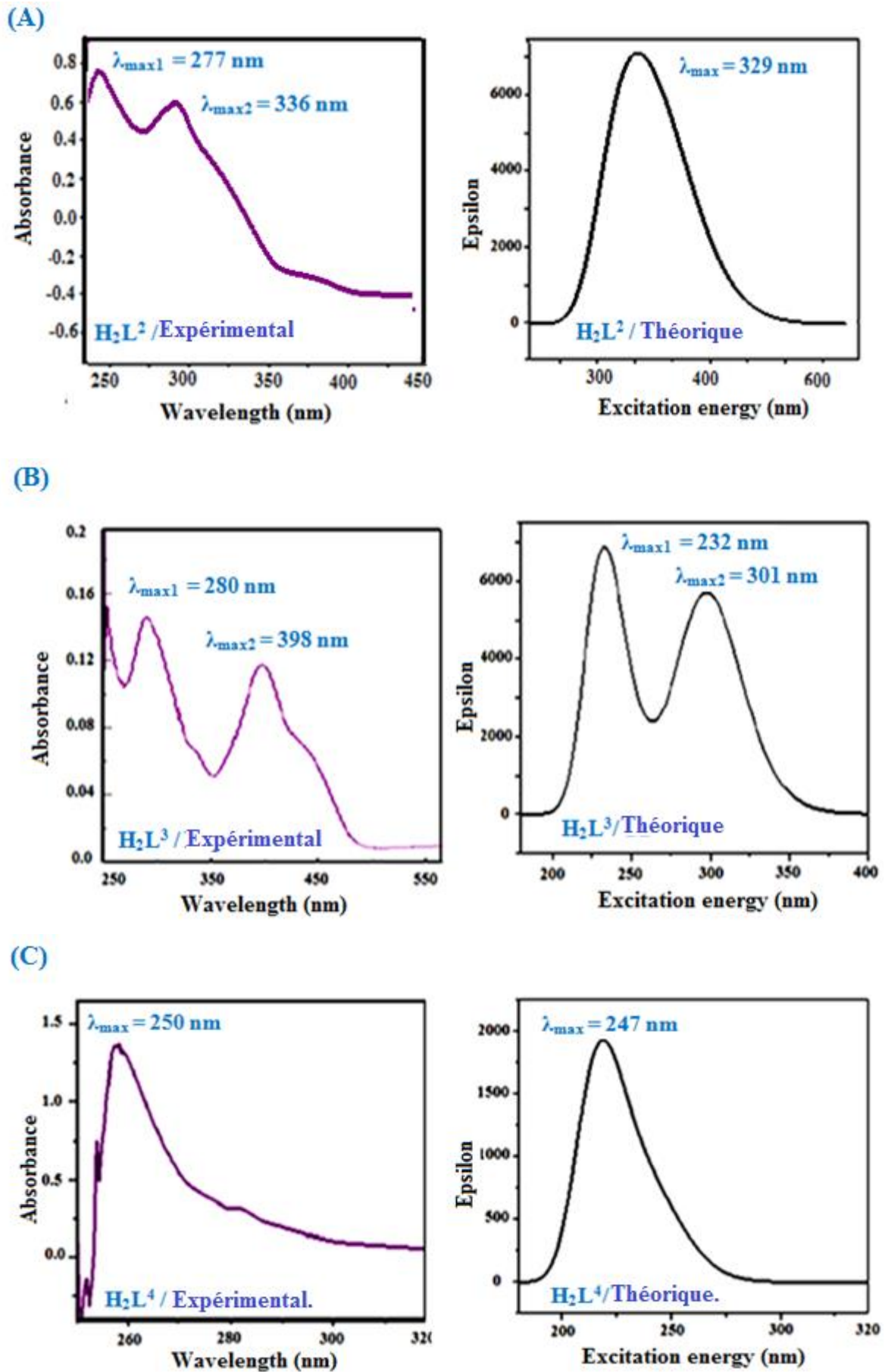
Tableau III.2. Transitions électroniques expérimentales et calculées, forces des oscillateurs et leur énergie d'excitation pour $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^2$, $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^3$, $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^4$ et $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^5$.

λ Exp (nm)	ϵ	λ Calcd (nm)	f_{os}	Etat	Composition de configurations (orbitales de transition correspondantes)	Énergie d'excitation (eV/nm)
$\mathbf{H}_2\mathbf{L}^2$						
336	33	358.55	0.1377	1	0.12143 (79 \rightarrow 84) 0.24317 (80 \rightarrow 84)	3.4556
					0.63922 (82 \rightarrow 84)	
		358.55	0.1377	2	0.18968 (82 \rightarrow 85) 0.66478 (83 \rightarrow 84)	3.4580
		332.36	0.0026	3	-0.12372 (78 \rightarrow 85) 0.14108 (79 \rightarrow 84)	3.7304
					0.46397 (80 \rightarrow 84) -0.22888 (82 \rightarrow 84)	
		329.96	0.0304	4	0.43571 (83 \rightarrow 85)	
					-0.14061 (78 \rightarrow 84) 0.11657 (79 \rightarrow 85)	3.7644
					0.22338 (80 \rightarrow 85) 0.60036 (82 \rightarrow 85)	
		323.37	0.1410	5	-0.22236 (83 \rightarrow 84)	
					-0.34127 (79 \rightarrow 84) -0.27934 (80 \rightarrow 84)	3.8342
					0.15593 (82 \rightarrow 84) 0.51307 (83 \rightarrow 85)	
277	26.6	312.08	0.1300	6	-0.33936 (78 \rightarrow 84) 0.18424(79 \rightarrow 85)	3.9729
					0.35879 (80 \rightarrow 85) 0.35507 (81 \rightarrow 84)	
					-0.29651 (82 \rightarrow 85)	
$\mathbf{H}_2\mathbf{L}^3$						
398	0.863	301.22	0.0634	1	0.68297 (59 \rightarrow 60)	4.1161
280	0.940	295.74	0.0772	2	-0.17465 (58 \rightarrow 60) 0.65960 (59 \rightarrow 61)	4.1923
					0.13102 (59 \rightarrow 63)	
		260.78	0.0096	3	0.62525 (58 \rightarrow 61) -0.29401 (59 \rightarrow 62)	4.7543
		251.53	0.0197	4	0.64917 (58 \rightarrow 60) 0.14259 (58 \rightarrow 62)	4.9292
					0.17634 (59 \rightarrow 61)	
		232.53	0.0814	5	-0.23986 (56 \rightarrow 61) 0.23241 (57 \rightarrow 60)	5.3319
					-0.13072 (59 \rightarrow 61) 0.58295 (59 \rightarrow 63)	
		231.36	0.0806	6	-0.10120 (55 \rightarrow 61) 0.26996 (58 \rightarrow 61)	5.3590
					0.24228 (58 \rightarrow 63) -0.13022 (58 \rightarrow 65)	
					0.56973 (59 \rightarrow 62)	

Suite du tableau III.2

					H_2L^4		
250	0.512	247.02	0.0068	1	0.58264 (48 → 52)	-0.17074 (49 → 52)	5.0192
		241.93	0.0043	2	-0.35285 (51 → 52)	0.21895 (50 → 52)	5.1249
		232.61	0.0067	3	0.19975 (51 → 53)	0.63266 (50 → 53)	5.3302
		230.73	0.0020	4	0.27504 (48 → 52)	-0.10676 (49 → 52)	5.3736
		217.33	0.0319	5	0.29009 (50 → 52)	-0.17495 (50 → 53)	5.7048
		215.70	0.0108	6	0.54256 (51 → 52)	0.60413 (50 → 52)	5.7481
					-0.18370 (48 → 52)	-0.14581 (50 → 53)	
					0.17451 (48 → 52)	0.10885 (48 → 56)	
					0.54205 (49 → 52)	0.29767 (49 → 54)	
					-0.17494 (51 → 53)	-0.12463 (51 → 55)	
					0.15105 (49 → 52)	0.19120 (51 → 53)	
					0.63521 (51 → 55)		
					H_2L^5		
320	0.634	333.94	0.0023	1	0.58237 (70 → 72)	0.25424 (70 → 73)	3.7127
		297.69	0.0533	2	-0.25539 (71 → 72)	-0.11240 (71 → 73)	4.1649
		280.69	0.0288	3	0.19408 (67 → 72)	-0.17806 (67 → 73)	4.4171
		279.11	0.0037	4	0.10620 (68 → 72)	-0.11566 (68 → 73)	4.4421
		271.69	0.0296	5	0.21208 (70 → 72)	-0.11433 (70 → 73)	4.5635
		262.44	0.0571	6	0.50042 (71 → 72)	-0.27286 (71 → 73)	4.7242
					-0.19024 (67 → 72)	0.21610 (67 → 73)	
					0.51280 (70 → 73)	0.33556 (71 → 72)	
					0.13845 (67 → 73)	0.29542 (70 → 72)	
					-0.18935 (70 → 73)	0.24341 (71 → 72)	
					0.52503 (71 → 73)		
					0.16061 (66 → 72)	-0.11009 (66 → 73)	
					0.36537 (67 → 72)	-0.28004 (67 → 73)	
					-0.11073 (68 → 75)	0.32029 (70 → 73)	
					0.29907 (71 → 73)		
					-0.26898 (66 → 72)	-0.13766 (66 → 73)	
					0.14643 (66 → 74)	0.22901 (67 → 72)	
					-0.12557 (68 → 72)	0.49340 (69 → 72)	
					0.19001 (69 → 74)		

\mathcal{E} = Coefficient d'absorption molaire ($\times 10^6$, $dm^3 \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$), f_{os} = Force de l'oscillateur.



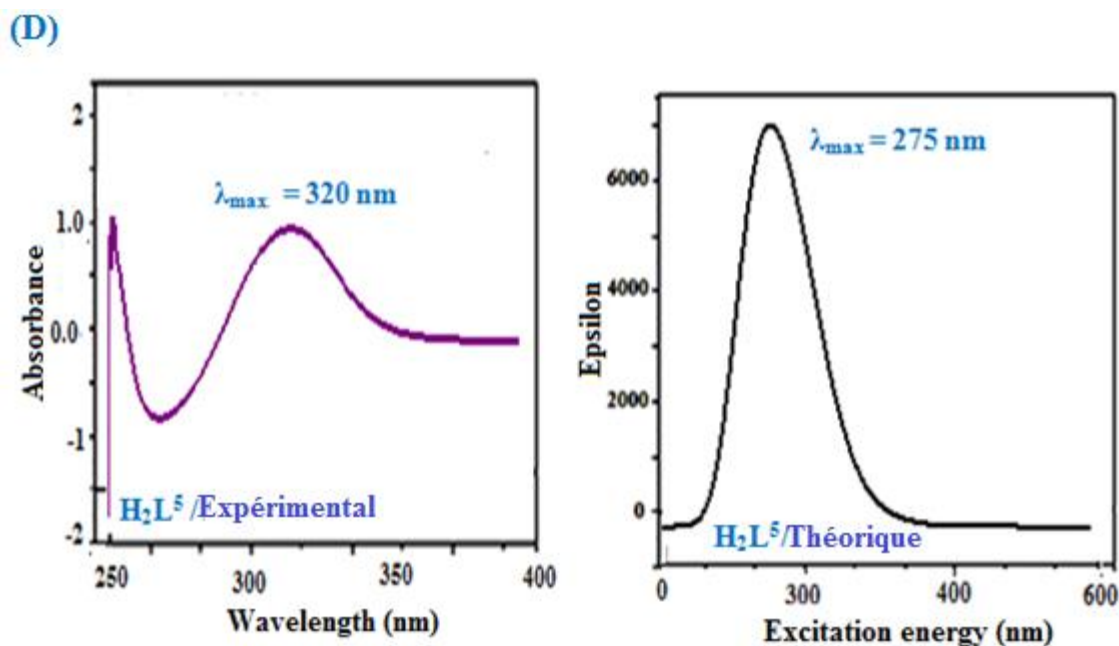


Figure III.3. Spectres électroniques expérimentaux (mauve) et calculés (noir) : (A) H_2L^2 ; (B) H_2L^3 ; (C) H_2L^4 et (D) H_2L^5 .

III.3.3. Structures géométriques optimisées

Les structures moléculaires optimisées avec le schéma de numérotation des ligands H_2L sont montrées sur la figure III.4. Les paramètres géométriques optimisés (longueur de liaison, angle de liaison et dièdres) des molécules du titre calculées par DFT avec B3LPY/6-31G (d, p) sont listés dans le tableau III.3.

La substitution du groupe phényle avec le groupe propyle dans H_2L^4 et le groupe ethyle dans H_2L^5 , les liaisons C-N attachées à la position substituée sont considérablement surestimées. Les distances de liaison C-C se situent dans la plage de 1,391 à 1,5399 Å pour tous les ligands, tandis que pour C = N, ces valeurs sont 1,2931 Å pour H_2L^2 , 1,2731 Å pour H_2L^3 , 1,2706-1,2731 Å pour H_2L^4 et 1,2859 Å pour H_2L^5 . Dans le cas des distances de liaison C-H, elles se situent dans la plage de 1,0488 à 1,0981 Å, de 1,081 à 1,091 Å, de 1,092 à 1,100 Å et de 1,1013 à 1,453 Å pour H_2L^2 , H_2L^3 , H_2L^4 et H_2L^5 , respectivement. Les liaisons O-H se trouvent pour H_2L^2 et H_2L^5 respectivement à 0,9954 et à 0,9977 Å alors que pour les liaisons S-H se trouvent à 1,347 Å pour H_2L^3 et à 1,376 Å pour H_2L^4 . L'angle N-C-C dans H_2L^2 , H_2L^3 , H_2L^4 et H_2L^5 , est approximativement le même à 125° et également pour l'angle N-C-S sont tous les mêmes à 114,6°. Tous les dièdres de quatre molécules sont proches de -179 ou +180 (voir le tableau III.3).

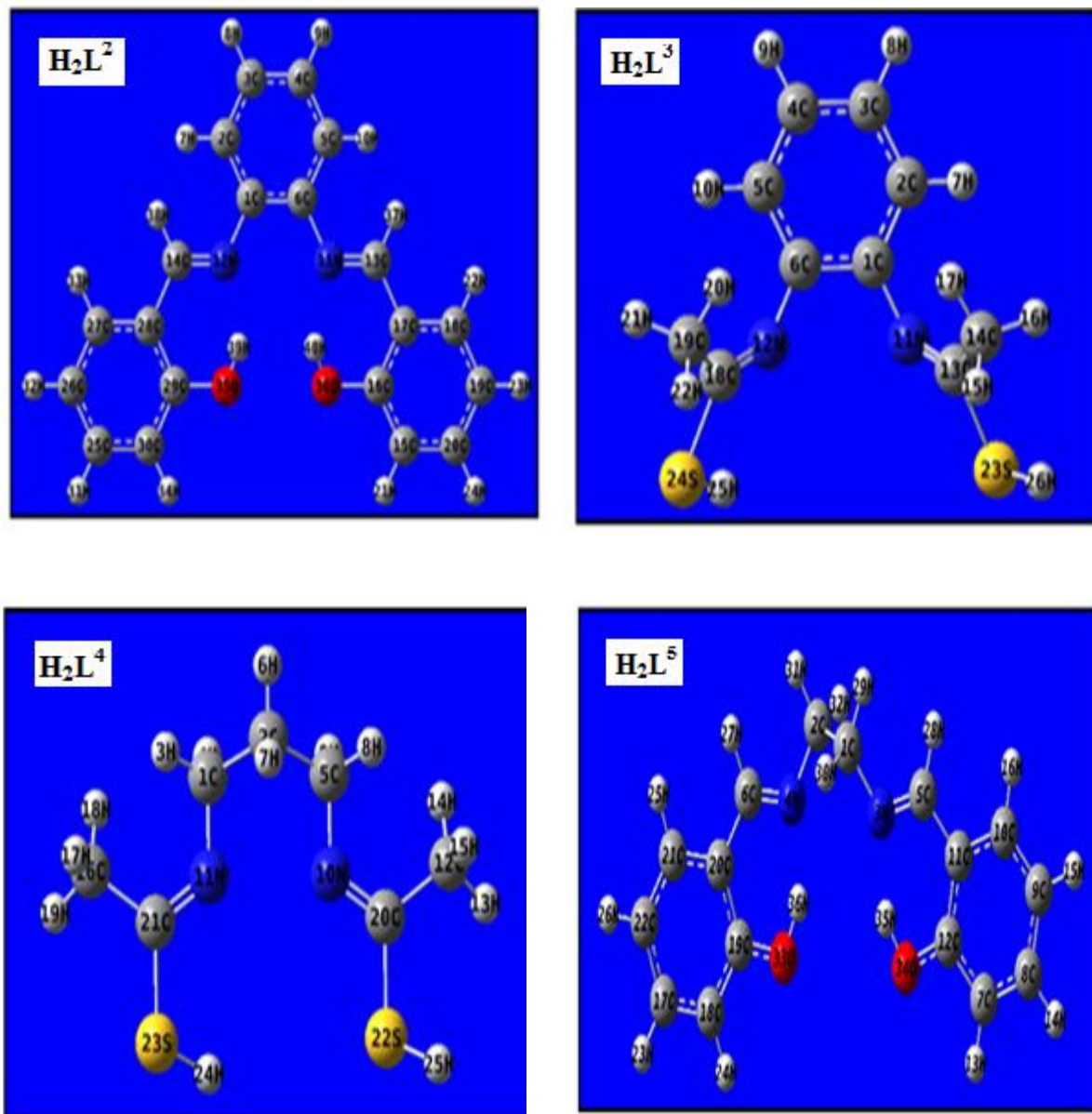


Figure III.4. Structures optimisées de H_2L^2 , H_2L^3 , H_2L^4 et H_2L^5 avec la numérotation des atomes calculée à partir de la méthode B3LYP/6-31G (d, p).

Tableau.III.3. Les paramètres structuraux calculés des ligands H₂L², H₂L³, H₂L⁴ et H₂L⁵.

H₂L²					
<u>Longueur de liaison (Å)</u>		<u>Angles de liaison (°)</u>		<u>Angles de dièdre (°)</u>	
C1-C6	1.4182	C1-C2-H7	118.8083	C6-C1-C2-C3	-0.352
C1-N12	1.4035	C4-C5-H10	120.0893	C6-C1-C2-H7	177.3594
C6-N11	1.4035	C1-C6-C5	119.083	N12-C1-C2-C3	-178.7177
C2-H7	1.0844	C1-C6-N11	118.7124	N12-C1-C2-H7	-1.0062
N11-C13	1.2931	C6-N11-C13	120.7287	C2-C1-C6-C5	0.0086
N12-C14	1.2931	C1-N11-C14	120.7307	C2-C1-C6-N11	-178.412
C13-C17	1.4478	N11-C13-C17	122.5096	N12-C1-C6-N11	0.011
C13-H37	1.0981	N11-C13-H37	120.8084	C2-C1-N12-C14	-41.2039
C14-H38	1.0981	C17-C13-H37	116.618	C6-C1-N12-C14	140.4246
C14-C28	1.4478	N12-C14-H38	120.8719	N11-C13-C17-C16	1.0117
C16-O36	1.3383	C28-C14-H38	116.6157	N11-C13-C17-C18	179.061
C29-O35	1.3383	C16-O36-H40	107.4526	H37-C13-C17-C16	-179.709
O35-H39	0.9954	C29-O35-H39	107.4579	N12-C14-C28-C29	-1.012
O36-H40	0.9954			H21-C15-C16-O36	-0.0515
				C15-C16-O36-H40	178.9432
				C28-C29-O35-H39	1.1407
				C30-C29-O35-H39	-178.9247
H₂L³					
<u>Longueur de liaison (Å)</u>		<u>Angles de liaison (°)</u>		<u>Angles de dièdre (°)</u>	
C1-C6	1,4034	C2-C1-H7	120,8976	C6-C1-C2-H8	-179,2622
C1-N11	1,4106	C3-C4-H10	120,9005	C1-C2-C3-C4	-0,0648
C6-N12	1,4106	C5-C4-H10	117,949	C1-C2-C3-H9	179,9446
N11-C13	1,2731	C4-C5-N11	118,4036	H8-C2-C3-H9	-0,0355
N12-C18	1,2731	C6-C5-N11	122,409	C2-C3-C4-C5	0,747
C13-C14	1,5097	C1-C6-C5	119,0244	C2-C3-C4-H10	-179,521
C13-S23	1,798	C1-C6-N12	118,4005	H9-C3-C4-C5	-179,2623
C14-H17	1,0951	C5-C6-N12	122,4147	H9-C3-C4-H10	0,4696
C18-C19	1,5097	C5-N11-C13	122,5117	H10-C4-C5-C6	178,1883
C18-S24	1,798	C6-N12-C18	122,5053	H10-C4-C5-N11	2,658
C19-H20	1,0951	N11-C13-C14	128,0329	C3-C4-H10-H15	-132,6618
C19-H21	1,0915	N11-C13-S23	114,3995	C5-C4-H10-H15	47,0785
S23-H26	1,3476	C14-C13-S23	117,5661	C4-C5-C6-C1	2,6996
S24-H25	1,3476	C13-C14-H16	111,0622	N11-C5-C6-C1	178,0423
		C13-C14-H17	109,8229	N11-C5-C6-N12	-6,6377
		C12-C18-S24	114,3963	C4-H10-H15-C14	-122,9893
		C19-C18-S24	117,58	C5-N11-C13-C14	2,2477
		C13-S23-H26	97,1669	S23-C13-C14-H16	-42,8818
		C18-S24-H25	97,1695	S23-C13-C14-H17	77,2911
H₂L⁴					
<u>Longueur de liaison (Å)</u>		<u>Angles de liaison (°)</u>		<u>Angles de dièdre (°)</u>	
C1-C2	1,5438	C2-C1-H3	108,7764	H3-C1-C2-C5	-147,3805
C1-H4	1,0996	C2-C1-N11	110,8978	H3-C1-C2-H7	89,1928
C1-N11	1,4751	H3-C1-H4	107,4061	H4-C1-C2-C5	-30,0399
C2-C5	1,5409	H3-C1-N11	105,8473	H4-C1-C2-H6	90,188
C5-N10	1,4674	C5-C2-H6	106,8877	C2-C1-N11-C21	-122,2362
N10-C20	1,2706	C5-C2-H7	110,2743	H3-C1-N11-C21	119,9541
N11-C21	1,2731	H6-C2-H7	107,1779	H4-C1-N11-C21	2,2681
C12-H15	1,0959	C2-C5-N10	112,1049	C1-C2-C5-N10	-52,5558

C16-C21	1,5101	C1-N11-C21	122,864	H7-C2-C5-H9	-173,2947
C20-S22	1,8742	H13-C12-H14	108,1866	H7-C2-C5-N10	69,6038
C21-S23	1,865	H13-C12-H15	107,744	C2-C5-N10-C20	-119,7071
S22-H25	1,3797	H13-C12-C20	110,558	H8-C5-N10-C20	4,2678
S23-H24	1,3765	H14-C12-H15	108,0318	H9-C5-N10-C20	121,6896
		N10-C20-S22	114,6496	H15-C12-C20-S22	-59,6102
		N11-C21-S23	117,8261	H18-C16-C21-N11	56,0383
H₂L⁵					
<hr/>					
<u>Longueur de liaison</u> (Å)		<u>Angles de liaison</u> (°)		<u>Angles de dièdre</u> (°)	
C1-C2	1.5399	C2-C1-N3	112.125	N3-C1-C2-N4	63.169
C1-N3	1.4496	C2-C1-H29	108.279	N3-C1-C2-H31	-173.183
C1-H29	1.1026	C2-C1-H3	108.102	N3-C1-C2-H32	-56.593
C2-N4	1.4496	N3-C1-H30	108.522	H29-C1-C2-N4	-173.188
N3-C5	1.2859	H29-C1-H30	107.727	C2-C1-N3-C5	120.636
N3-H35	1.2859	C1-C2-N4	112.125	H29-C1-N3-C5	-1.09
N4-C6	1.2859	N4-C2-H32	108.523	H30-C1-N3-C5	-119.687
C5-H28	1.1013	H31-C2-H32	107.726	N3-C5-C11-C10	179.762
C6-H20	1.453	C1-N3-C5	119.172	N3-C5-C11-C12	-0.3574
C7-C8	1.3884	C2-N4-C6	119.173	C8-C7-C12-O34	-179.874
C7-C12	1.4044	N3-C5-C11	122.573	H13-C7-C12-O34	-179.956
C10-C11	1.4077	N3-C5-H28	120.983	C10-C11-C12-O34	179.808
C11-C12	1.4227	C11-C5-H28	116.443	C7-C12-O34-H35	-179.977
C12-O34	1.3389	N4-C6-H20	122.572	C11-C12-O34-H35	0.129
C19-O33	1.3389	C20-C6-H27	116.443		
O33-H36	0.9977	C18-C19-O13	118.750		
O34-H35	0.9977	C20-C19-O33	122.011		
		C19-O33-H36	107.413		
		C12-O34-H35	107.408		

III.3.4. Analyse des orbitales moléculaires frontalières (FMO)

Les HOMO et LUMO sont appelées Orbitales Moléculaires Frontière (FMO), qui ont joué un rôle important dans l'évaluation de la stabilité chimique moléculaire, de la réactivité chimique et de la dureté/douceur de la molécule. L'énergie HOMO et LUMO, gap énergétique, potentiel d'ionisation (I), affinité électronique (A), électronégativité (χ), potentiel chimique électronique (μ), dureté chimique (η), Le degré de douceur moléculaire (S) et l'indice d'électrophilicité (ω) sont listés dans le tableau III.4.

Dans notre travail, **H₂L⁴** a un plus grand écart énergétique que **H₂L²**, **H₂L³** et **H₂L⁵**. Le déficit énergétique ($E_{\text{HOMO}} - E_{\text{LUMO}}$) intervient directement dans la dureté/douceur d'une espèce chimique. Une plus grande valeur d'espace énergétique représente plus de dureté ou moins de souplesse d'un composé ; ainsi, **H₂L⁴** est appelée molécule dure et l'ordre de stabilité est : **H₂L⁴** (0.11089 a.u) > **H₂L³** (0.09257 a.u) > **H₂L⁵** (0.07503 a.u) > **H₂L²** (0.07181a.u).

Le potentiel chimique du descripteur de réactivité globale (I), représenté par l'énergie HOMO, provient de la distribution des charges entre deux systèmes ayant des potentiels

chimiques différents. Le potentiel d'ionisation (I) de $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^2$, $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^3$, $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^4$ et $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^5$ est respectivement 0.20862, 0,20830, 0,22282 et 0.21750 a.u, comme indiqué dans le tableau III.4, ce qui indique clairement que le ligand $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^4$ a plus tendance à donner des électrons que les autres ligands. Un autre indice d'électrophilicité du descripteur de réactivité globale (ω) décrit la capacité d'acceptation des électrons des systèmes tout à fait similaire à (η) et (I). Des valeurs élevées de l'indice d'électrophilicité augmentent les capacités d'acceptation des électrons des molécules. Ainsi, le ligand $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^2$ se révèle être le nucléophile le plus fort, alors que le ligand $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^4$ est l'électrophile le plus fort. Les valeurs du potentiel chimique électronique pour les quatre bases de Schiff sont présentées dans le tableau III.3. Le plus grand potentiel chimique électronique (valeurs absolues) est le moins stable ou le plus réactif. La tendance du potentiel chimique électronique est $|\mu \mathbf{H}_2\mathbf{L}^2| > |\mu \mathbf{H}_2\mathbf{L}^5| > |\mu \mathbf{H}_2\mathbf{L}^3| > |\mu \mathbf{H}_2\mathbf{L}^4|$.

Tablea III.4. Comparaison de HOMO, LUMO, gap énergétique (HOMO-LUMO) et propriétés moléculaires associées des $\mathbf{H}_2\mathbf{L}$ (a.u).

Energie moléculaire	$\mathbf{H}_2\mathbf{L}^2$	$\mathbf{H}_2\mathbf{L}^3$	$\mathbf{H}_2\mathbf{L}^4$	$\mathbf{H}_2\mathbf{L}^5$
Potentiel d'ionisation (I)	0.20862	0.20830	0.22282	0.21750
Affinité Electronique (A)	0.06530	0.03147	0.00103	0.05667
potentiel Chimique Electronique (μ)	-0.13711	-0.11572	-0.11192	-0.13708
Electronégativité (χ)	0.13711	0.11572	0.11192	0.13708
Dureté Chimique (η)	0.07181	0.09257	0.11089	0.07503
Mollesse (S)	6.96281	5.40131	4.50876	6.99400
Indice d'Electrophilicité (ω)	0.13089	0.07232	0.05647	0.12521
E_{HOMO}	-0.20862	-0.20830	-0.22282	-0.21750
$E_{\text{HOMO}-1}$	-0.21687	-0.23163	-0.23584	-0.21477
E_{LUMO}	-0.06530	-0.02314	-0.00103	-0.05667
$E_{\text{LUMO}+1}$	-0.05720	-0.02041	-0.00179	-0.04986
$E_{\text{HOMO}}-E_{\text{LUMO}}$	0.14362	0.18516	0.22179	0.15607
$E_{\text{HOMO}-1}-E_{\text{LUMO}+1}$	0.16150	0.20236	0.23409	0.16491

$$I = -E_{\text{HOMO}}, A = -E_{\text{LUMO}}, \mu = 1/2(E_{\text{HOMO}} + E_{\text{LUMO}}), S = 1/2 \eta$$

$$\chi = -(E_{\text{LUMO}}+E_{\text{HOMO}})/2, \eta = 1/2(E_{\text{LUMO}}-E_{\text{HOMO}}), \omega = \mu^2/2\eta.$$

Le moment dipolaire calculé pour les ligands bases de Schiff synthétisés est donné dans le tableau III.5. montre que la valeur du moment dipolaire de $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^3$ (4.8359 debye) > $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^4$ (3.7465 debye) > $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^2$ (3.6007debye) > $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^5$ (1.8616 debye). Il est bien connu que plus la valeur du moment dipolaire est élevée plus elle est importante pour des propriétés optiques non linéaires.

La distribution de la densité électronique des quatre ligands est illustrée dans la figure III. 5.

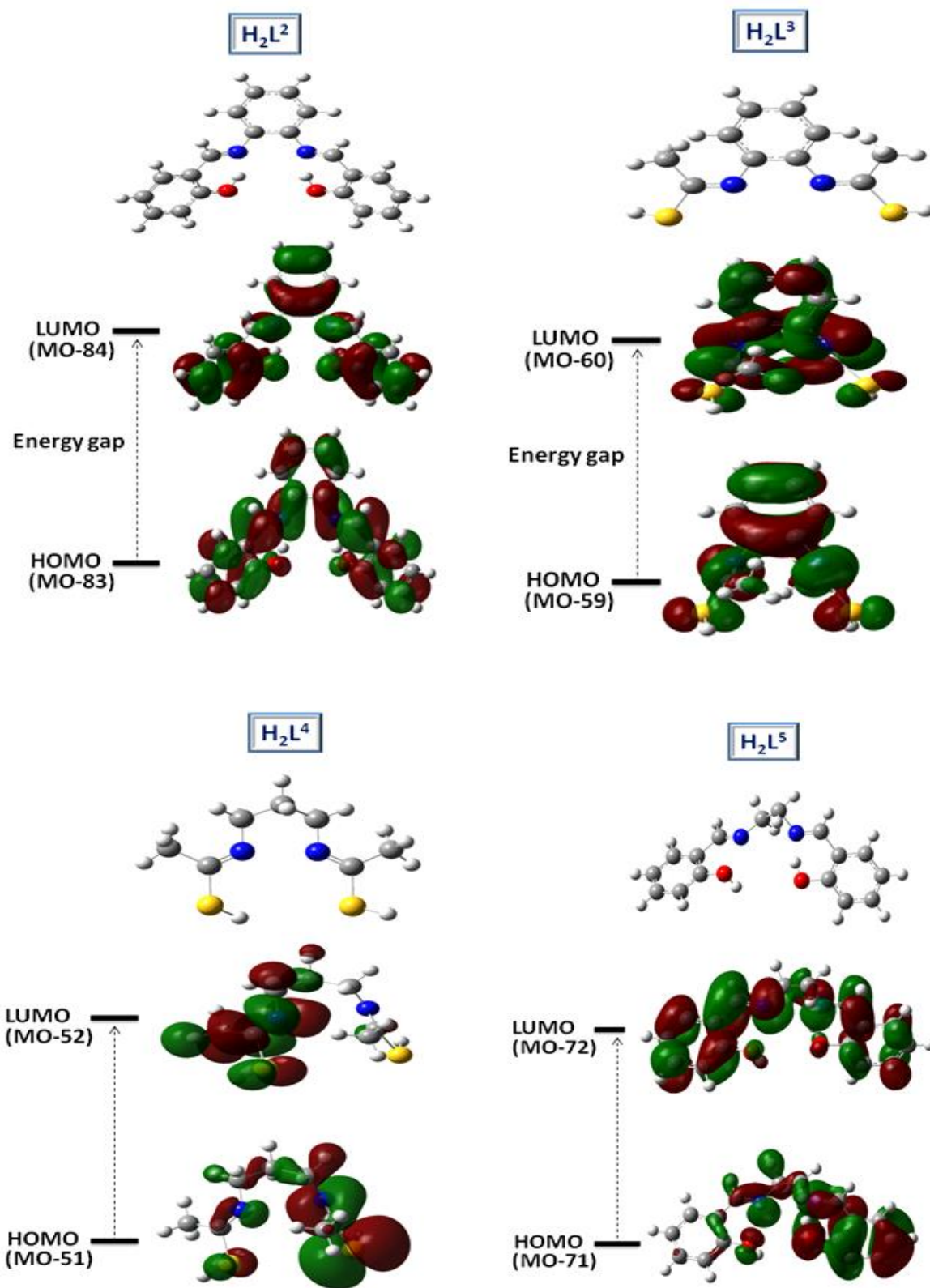


Figure III. 5. Schémas des orbitales HOMO, LUMO des ligands H_2L^2 , H_2L^3 , H_2L^4 et H_2L^5 obtenues avec la méthode DFT-B3LYP/6-31G (d, p).

Les polarisabilités, l'anisotropie des polarisabilités et les hyperpolarisabilités des composés synthétisés ont été calculées en utilisant la DFT avec la méthode B3LYP 6-31G (d, p) et sont présentées dans le tableau III.5. La polarisabilité $\langle\alpha\rangle$ pour $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^2$, $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^3$, $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^4$ et $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^5$ est de -126.640, -94.461, -78.713 et -106.054 (a.u), respectivement. L'anisotropie de la polarisabilité $\Delta\alpha$ est calculée comme étant 25.091, 14.6209, 15.9053 et 28.505 (a.u) pour $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^2$, $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^3$, $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^4$ et $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^5$, respectivement. D'après les calculs actuels, la polarisabilité de $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^4$ sont supérieures à $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^2$, $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^3$ et $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^5$ calculées au même niveau théorique et au même ensemble de bases 6-31G (d, p). Ceci est très bien lié au plus petit gap énergétique orbital frontière de ligand $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^2$ par rapport aux autres ligands. Le total des premières valeurs d'hyperpolarisabilité $\langle\beta_{\text{tot}}\rangle$ est respectivement de 37.375, 68.611, 60.771 et 33.728 (a.u) pour $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^2$, $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^3$, $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^4$ et $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^5$.

Tableau III.5. Les moments dipolaires électriques (Debye), la polarisabilité (en a.u), les composants β et la valeur β_{tot} de $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^2$, $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^3$, $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^4$ et $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^5$ calculés par B3LYP/6-31G (d, p).

Paramètres	$\mathbf{H}_2\mathbf{L}^2$	$\mathbf{H}_2\mathbf{L}^3$	$\mathbf{H}_2\mathbf{L}^4$	$\mathbf{H}_2\mathbf{L}^5$
μ_x	-0.0002	1.1022	3.2962	0.2682
μ_y	2.3956	2.5872	1.7738	1.2436
μ_z	2.6882	3.9341	-0.1569	-1.3586
μ_{tot}	3.6007	4.8359	3.7465	1.8616
α_{xx}	-117.063	-88.2427	-75.9388	-96.125
α_{yy}	-122.539	-96.4853	-79.8814	-106.132
α_{zz}	-140.320	-96.0091	-80.3211	6.073
α_{xy}	-0.0030	-3.7842	-5.5620	7.171
α_{xz}	0.0027	5.4331	2.8195	-115.905
α_{yz}	0.7592	-1.5671	-0.5313	-2.329
$\langle\alpha\rangle$	-126.640	-94.461	-78.713	-106.054
$\Delta\alpha^\circ$	25.091	14.6205	15.9053	28.505
β_{xxx}	-0.0175	39.7627	56.0566	-12.243
β_{xxy}	-30.765	16.7141	-4.2013	-28.886
β_{xyy}	-0.0044	10.7854	12.3393	10.768
β_{yyy}	11.7717	28.5613	10.7953	6.738
β_{xxz}	45.326	35.7032	-6.7836	-7.593
β_{xyz}	0.00083	-14.7787	1.3027	29.126
β_{yyz}	-10.373	-3.4751	-1.2531	3.115
β_{xzz}	0.016	-5.8783	-9.4651	-9.148
β_{yzz}	-2.238	-14.0744	-2.6485	4.145
β_{zzz}	-4.1898	9.4735	-6.3036	-1.3376
β_{tot}	37.375	68.611	60.771	33.728

III.3.5. Charges atomiques Mulliken

Les charges atomiques Mulliken pour les ligands H_2L^2 , H_2L^3 , H_2L^4 et H_2L^5 calculées au B3LYP/6-31G (d, p) sont présentées dans le tableau III.6 et les diagrammes à barres des charges atomiques sont montrés à la figure III.6.

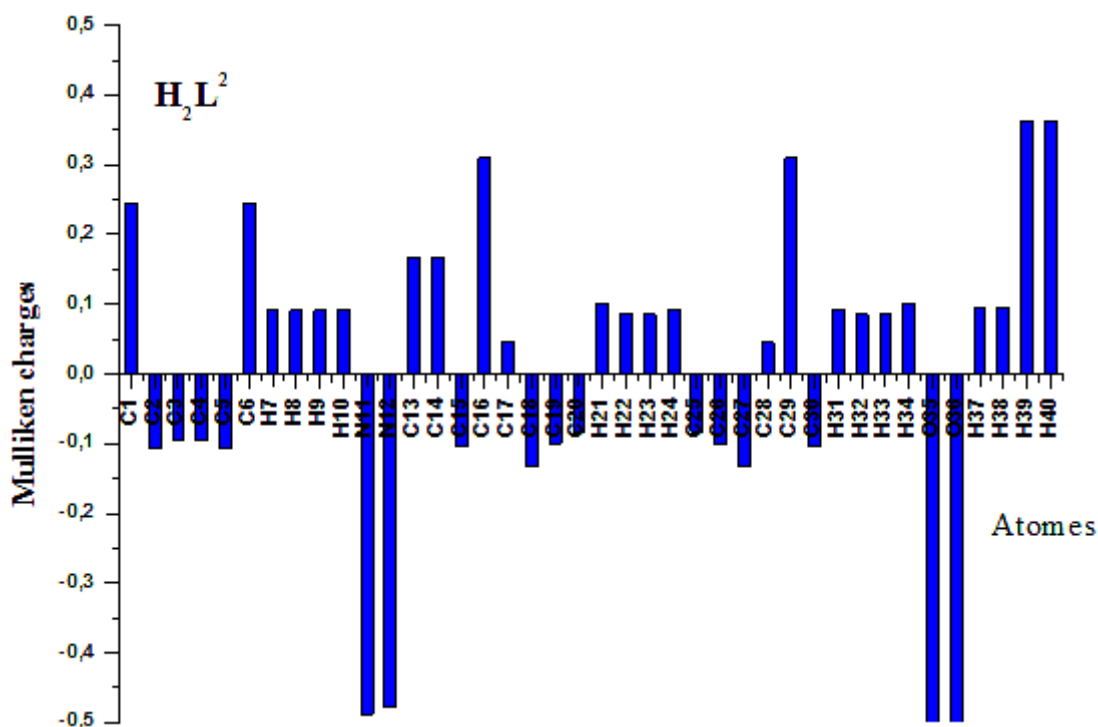
Tableau III.6. Charges atomiques Mulliken calculées par B3LYP/6-31G (d, p) de H_2L^2 , H_2L^3 , H_2L^4 et H_2L^5 .

Atome	H_2L^2	Atome	H_2L^3	Atome	H_2L^4	Atome	H_2L^5
C1	0,24432	C1	0,09952	C1	0.047831	C1	-0,05385
C2	-0,10768	C2	-0,09396	C2	-0.174881	C2	-0,03003
C3	-0,0947	C3	-0,09399	H3	0.081598	N3	-0,46662
C4	-0,0947	C4	-0,09946	H4	0.106276	N4	-0,35479
C5	-0,10766	C5	-0,19012	C5	0.068250	C5	0,09261
C6	0,24428	C6	0,19007	H6	0.092305	C6	0,09047
H7	0,09326	H7	0,09331	H7	0.116249	C7	-0,09996
H8	0,09044	H8	0,08444	H8	0.075747	C8	-0,0855
H9	0,09044	H9	0,08445	H9	0.111020	C9	-0,09638
H10	0,09326	H10	0,09331	N10	-0.395397	C10	-0,13765
N11	-0,48784	N11	-0,45801	N11	-0.382177	C11	0,07505
N12	-0,47785	N12	-0,45792	C12	-0.366796	C12	0,27214
C13	0,16753	C13	0,11687	H13	0.140650	H13	0,09639
C14	0,16752	C14	-0,35562	H14	0.131412	H14	0,08993
C15	-0,10353	H15	0,15009	H15	0.137844	H15	0,08162
C16	0,30982	H16	0,12042	C16	-0.370263	H16	0,08556
C17	0,04547	H17	0,16492	H17	0.119839	C17	-0,08655
C18	-0,13338	C18	0,11674	H18	0.130228	C18	-0,09138
C19	-0,10008	C19	-0,35561	H19	0.168531	C19	0,24582
C20	-0,08295	H20	0,16512	C20	0.128770	C20	0,09606
H21	0,10137	H21	0,15004	C21	0.122573	C21	-0,13882
H22	0,08575	H22	0,12026	S22	-0.028083	C22	-0,08958
H23	0,08521	S23	-0,03251	S23	-0.012068	H23	0,0911
H24	0,09189	S24	-0,03258	H24	0.181314	H24	0,09583
C25	-0,08295	H25	0,19441	H25	0.145223	H25	0,08909
C26	-0,10008	H26	0,19444			H26	0,08619
C27	-0,13338					H27	0,07232
C28	0,04548					H28	0,07916
C29	0,30983					H29	0,10302
C30	-0,10354					H30	0,17987
H31	0,09188					H31	0,06967
H32	0,08521					H32	0,12362
H33	0,08575					O33	-0,55907
H34	0,10137					O34	-0,57918
O35	-0,56366					H35	0,33211
O36	-0,56365					H36	0,32172
H37	0,09578						
H38	0,09578						
H39	0,363						
H40	0,36301						

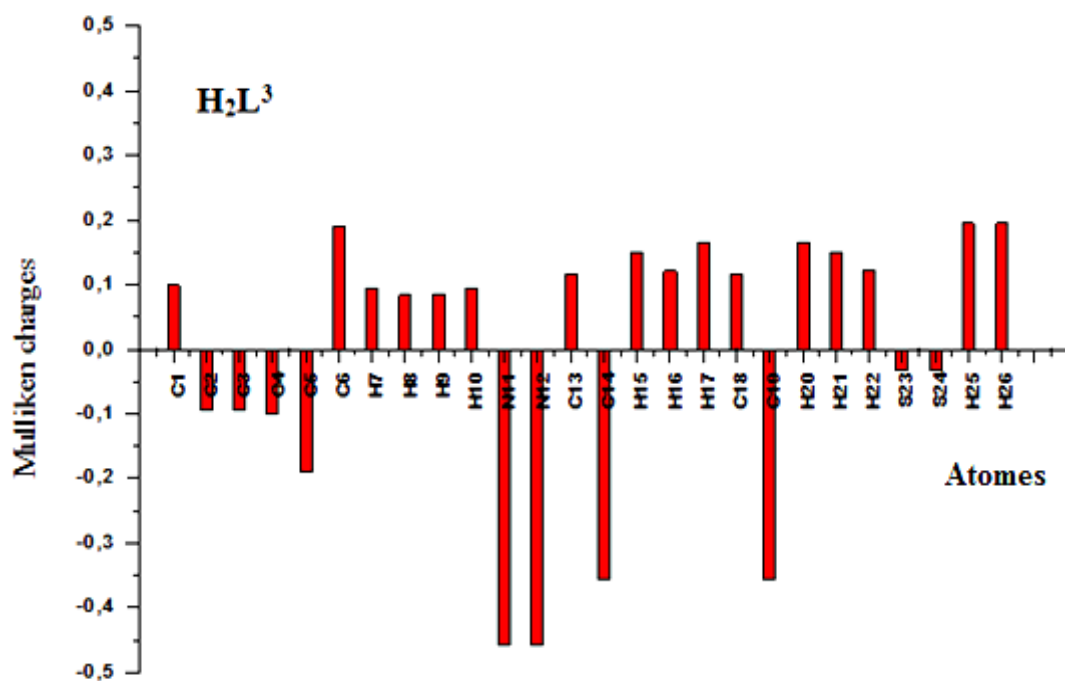
Il est intéressant de mentionner que les atomes C1/C6/C13/C14/C16/C17/C28/C29, C1/C6/C13/C18, C1/C5/C20/C21 et C5/C6/C11/C12/C19/C20 de H_2L^2 , H_2L^3 , H_2L^4 et H_2L^5 portent, respectivement, une charge positive tandis que les autres atomes de carbone portent une charge négative. Cependant, tous les atomes d'hydrogène affichent une charge positive nette (Tableau III.6).

Les charges atomiques Mulliken montrent également que les atomes H attachés aux atomes d'oxygène ou de soufre ont une plus grande charge atomique positive que les autres atomes d'hydrogène. Cela peut être dû à la présence d'atomes d'oxygène ou de soufre électro-négatifs. La distribution des charges de Mulliken montre que l'atome d'azote N d'azométhine est plus négatif par rapport aux autres atomes de tous les composés sélectionnés.

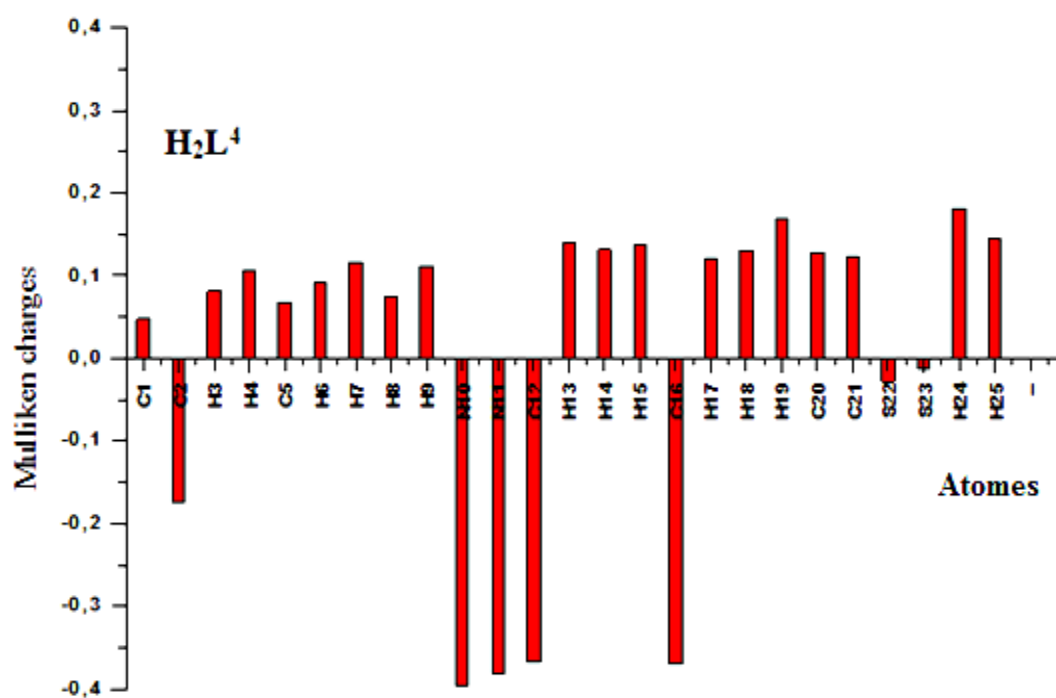
(A)



(B)



(C)



(D)

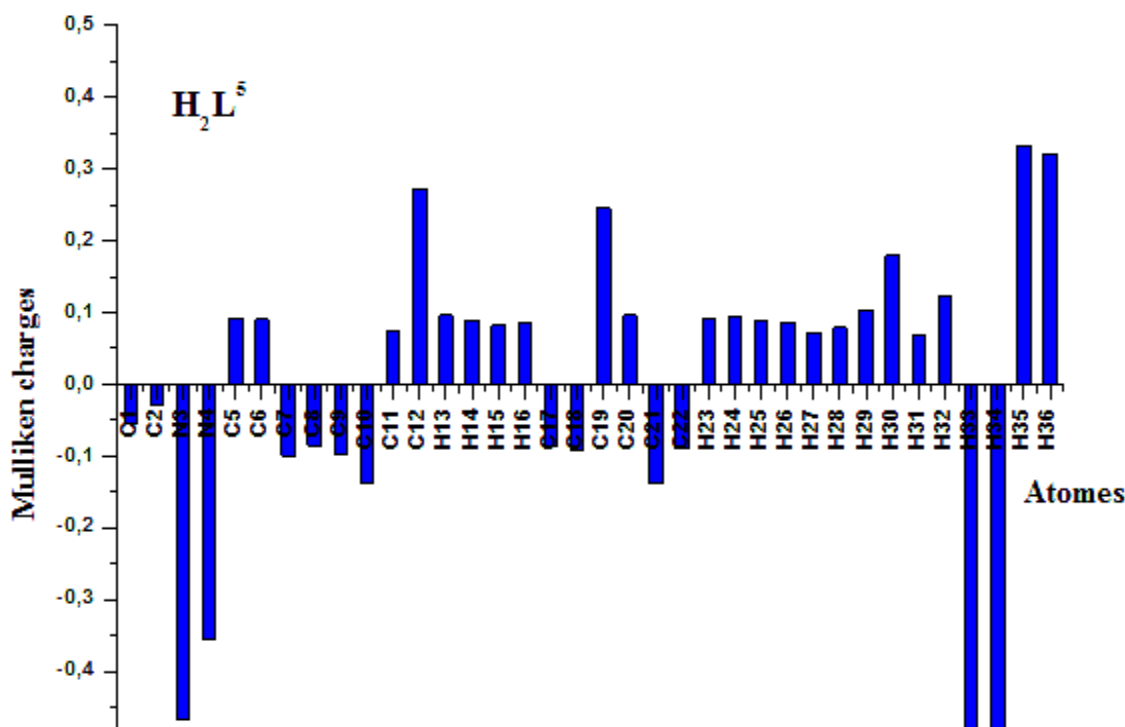
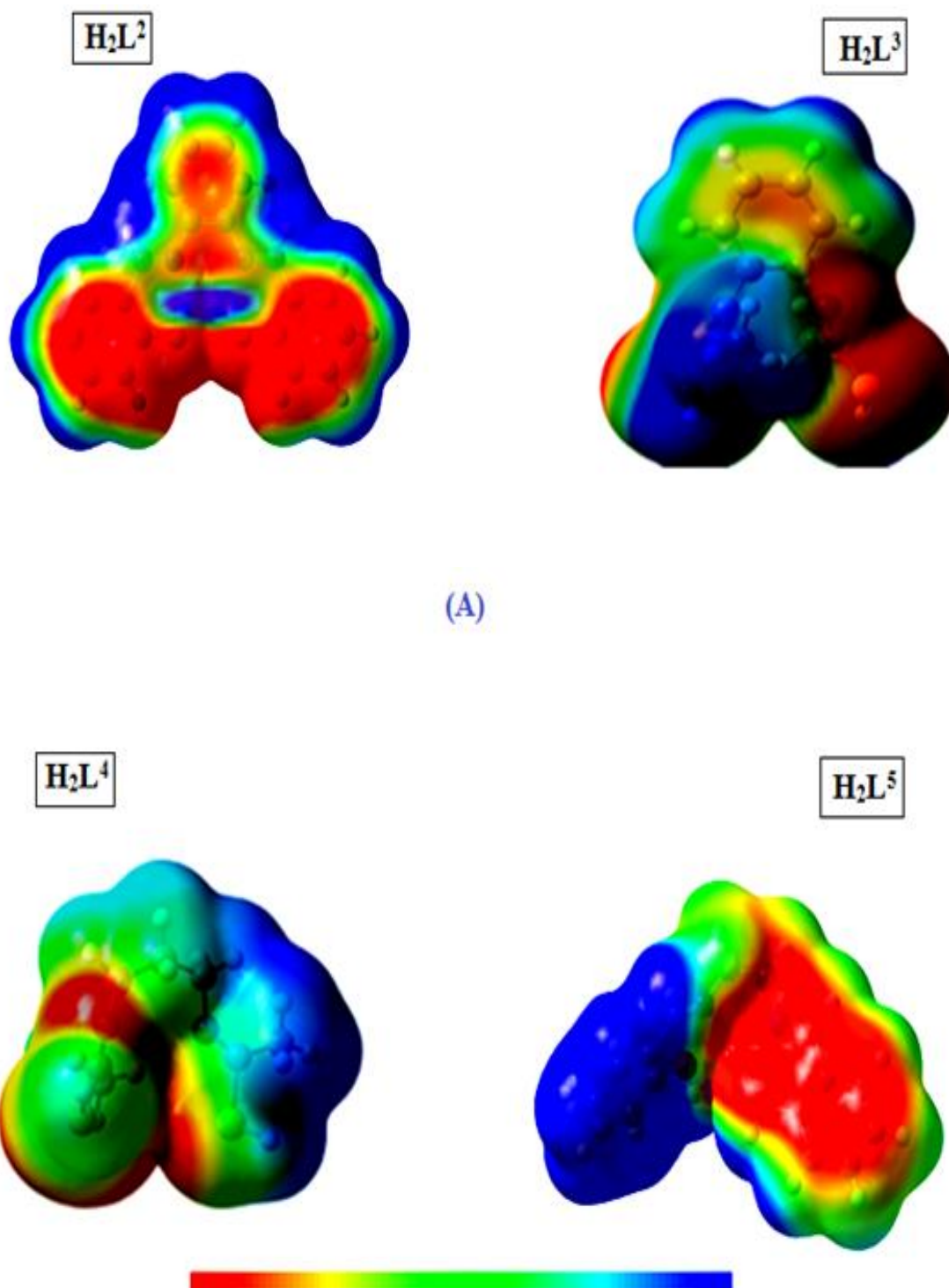


Figure III.6. La distribution de la charge atomique Mulliken de (A) H₂L²; (B) H₂L³; (C) H₂L⁴ et (D) H₂L⁵.

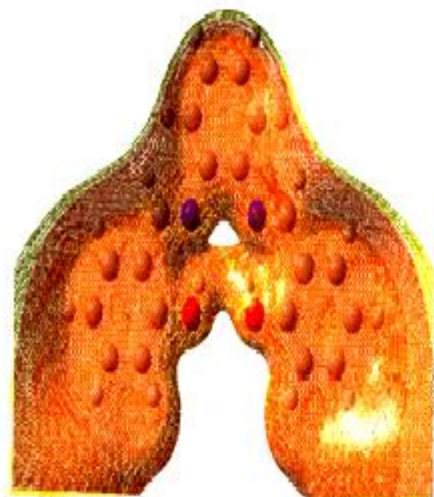
III.3.6. Analyse du potentiel électrostatique moléculaire

À cette fin, les potentiels électrostatiques moléculaires (MEP) ont été calculés pour H₂L², H₂L³, H₂L⁴ et H₂L⁵ au niveau B3LYP/6-31G (d, p). Dans les tracés MEP, la densité électronique totale cartographiée avec une surface de potentiel électrostatique des ligands est représentée sur la figure III.7A, III.7B et III.7C.

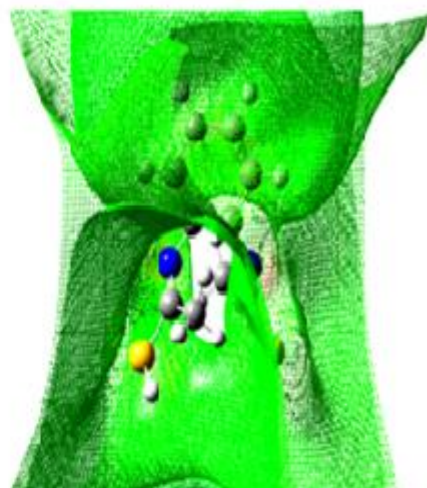
Comme représenté sur les figures III.7A et III.7C, les régions négatives représentées par la couleur rouge sont les sites préférables pour l'attaque électrophile, et les régions positives représentées par la couleur bleue sont des sites favorables pour l'attaque nucléophile. Ici, les potentiels négatifs sont générés sur les atomes d'oxygène ou de soufre électronégatifs O34, O35, O36, S23 et S24 et les atomes d'azote N3, N4, N10, N11 et N12 tandis que les atomes H ont une région de potentiel positive dans les structures. Ces sites négatifs et positifs permettent de prédire les régions dans un composé responsable des interactions non covalentes³³.



H_2L^2



H_2L^3

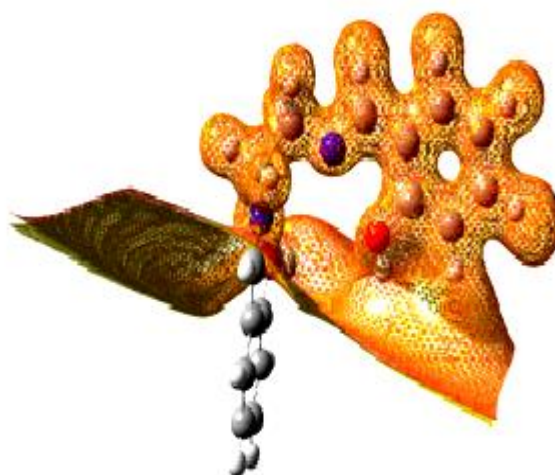


(B)

H_2L^4



H_2L^5



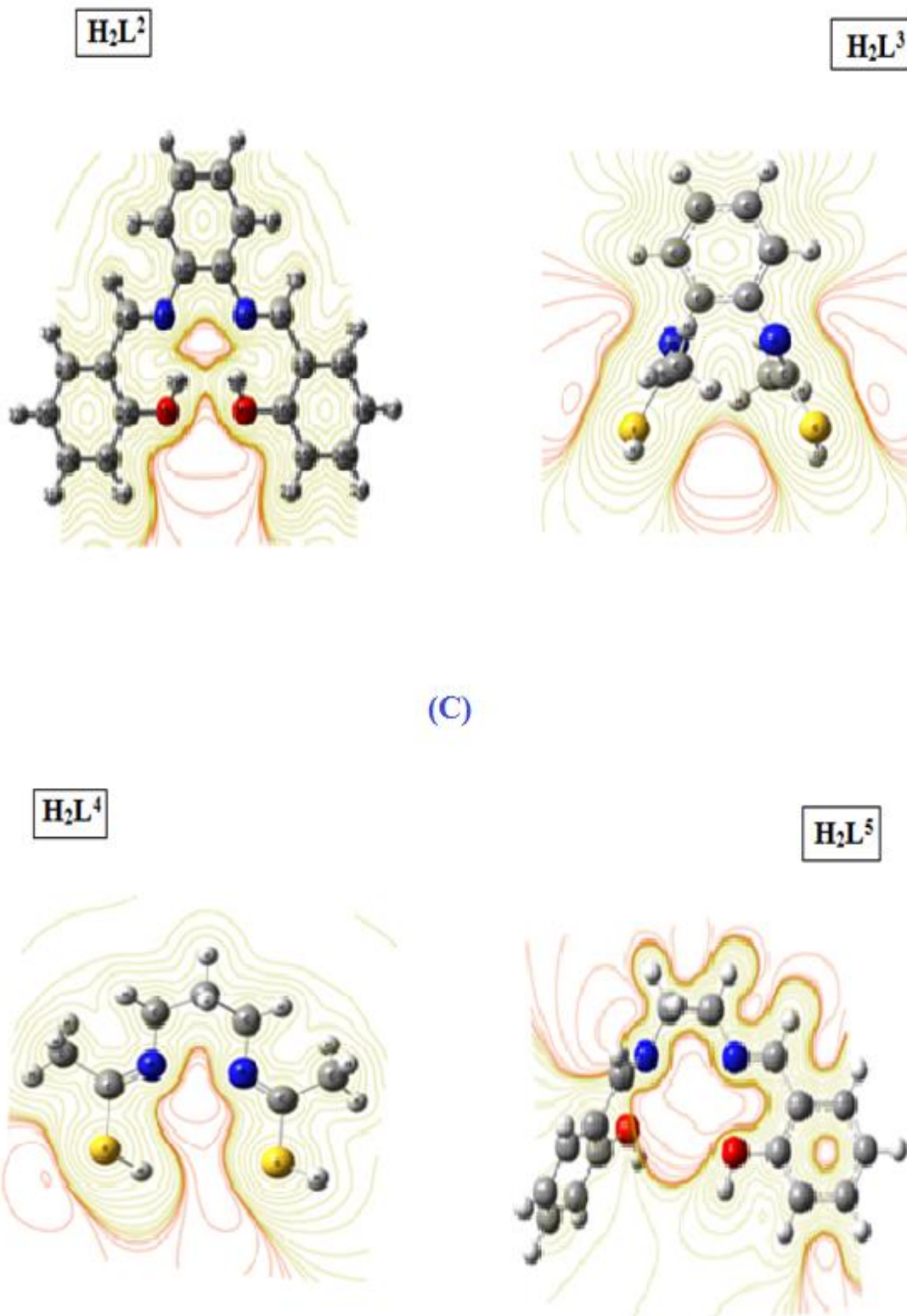


Figure. III.7. (A) La surface totale de densité d'électrons cartographiée avec le tracé du potentiel électrostatique (MEP) de H_2L^2 , H_2L^3 , H_2L^4 et H_2L^5 . Isovalue = 0,0004. Niveau de calcul: B3LYP / 6-31G (d, p) ; (B) La surface de potentiel électrostatique et (C) la carte de contour du potentiel électrostatique de H_2L^2 , H_2L^3 , H_2L^4 et H_2L^5 .

III.3.7. Propriétés thermodynamiques

Sur la base de l'analyse vibrationnelle, les paramètres thermodynamiques aux constantes de rotation, de température et de pression standard (298,15 K et 1 atm) pour les ligands bases de Schiff synthétisés ont été obtenus par la méthode DFT-B3LYP/6-31-G (d, p) et présenter dans le tableau III.7.

L'énergie minimale globale obtenue pour $\mathbf{H_2L^2}$, $\mathbf{H_2L^3}$, $\mathbf{H_2L^4}$ et $\mathbf{H_2L^5}$ sont respectivement, -1031.654, -1293.845, -1180.847 et -879.150 a.u. Les données thermodynamiques fournissent des informations utiles pour l'étude ultérieure sur le composé, lorsque celles-ci peuvent être utilisées comme réactif pour prendre part à une nouvelle réaction.

Tableau.III.7. Paramètres thermodynamiques calculés de H_2L^2 , H_2L^3 , H_2L^4 et H_2L^5 en utilisant la méthode B3LYP/6-31G (d, p).

	H_2L^2	H_2L^3	H_2L^4	H_2L^5
SCF (a.u)	-1031.654	-1293.845	-1180.847	-879.150
Dipole moment (Debye)				
X	-0.0002	1.1022	3.2962	0.2682
Y	2.3956	2.5872	1.7738	1.2436
Z	2.6882	3.9341	-0.1569	-1.3586
TOT	3.6007	4.8359	3.7465	1.8616
	E (Thermal)	CV	S	
	KCal/Mol	Cal/MolKelvin	Cal/MolKelvin	
H_2L^2				
Total	205.663	73.179	133.512	
Electronic	0.000	0.000	0.000	
Translational	0.889	2.981	43.149	
Rotational	0.889	2.981	35.519	
Vibrational	203.885	67.217	54.844	
H_2L^3				
Total	133.581	55.493	127.238	
Electronic	0.000	0.000	0.000	
Translational	0.889	2.981	42.123	
Rotational	0.889	2.981	33.028	
Vibrational	131.804	49.532	52.088	
H_2L^4				
Total	136.446	50.292	123.256	
Electronic	0.000	0.000	0.000	
Translational	0.889	2.981	41.632	
Rotational	0.889	2.981	31.763	
Vibrational	134.669	44.331	49.861	
H_2L^5				
Total	187.750	57.600	114.303	
Electronic	0.000	0.000	0.000	
Translational	0.889	2.981	42.658	
Rotational	0.889	2.981	34.501	
Vibrational	185.972	51.638	37.144	

Références bibliographiques

1. D.M. Hirst, *A Computational Approach to Chemistry*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, (1990).
2. P. Hohenberg, W. Kohn, Inhomogeneous Electron Gas, *Phys. Rev. B.* **136** (1964) 864-871.
3. P. Labute, A widely applicable set of descriptors, *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, **18** (2000) 464 - 477.
4. J. Higo and N. Go, —Algorithm for rapid calculation of excluded volume of large molecules, *Journal of Computational Chemistry*, **10** (1989) 376-379.
5. R. Bosque, J. Sales, E. Bosch, M. Rosès, M.C. Garcia-Alvarez-Coque, and J.R. Torres-Lapasio, -A QSPR study of the p-solute polarity parameter to estimate retention in HPLC, *Journal of Chemical Information and Modeling*, **43** (2003) 1240-1247.
6. J.G. Małecki, Synthesis, crystal, molecular and electronic structures of thiocyanate ruthenium complexes with pyridine and its derivatives as ligands, *Polyhedron*, **29** (2010) 1973-1979.
7. J. M. Seminario, Recent Developments and Applications of Modern Density Functional Theory, vol. 4, Elsevier, Amsterdam, (1996) 835.
8. A.E. Reed, F. Weinhold, Natural localized molecular orbitals, *J. Chem. Phys.* **83** (1985) 1736-1740.
9. E. Scrocco, J. Tomasi, The Electrostatic Molecular Potential as a Tool for the Interpretation of Molecular Properties. Topics in Current Chemistry, **42** (1973) 95-170.
10. F.J. Luque, J.M. Lopez, M. Orozco, Perspective on Electrostatic interactions of a solute with a continuum. A direct utilization of ab initio molecular potentials for the prevision of solvent effects, *Theor. Chem. Acc.* **103** (2000) 343-345.
11. C. Hansch and E. Coats, α -Chymotrypsin: A Case Study of Substituent Constants and Regression Analysis in Enzymic Structure-Activity Relationships, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **59** (1970) 731-743.
12. P.M. Anbarasan, P. S. Kumar, K. Vasudevan, R. Govindan, A. Prakasam, M. Geetha, Geometrical, electronic structure, nonlinear optical and spectroscopic investigations of 4-(phenylthio)phthalonitrile dye sensitizer for solar cells using quantum chemical calculations, *Eur J Chem*, **2** (2011) 206-213
13. F. Neese, A critical evaluation of DFT, including time-dependent DFT, applied to bioinorganic chemistry, *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, **11** (2006) 702-711.
14. I.I.R. Denning, T. Keith, J. Millam, K. Eppinnett, W.L. Hovell, R. Gilliland, GaussView Version 3.09, Semichem Shawnee Mission, KS, USA, 2003 P.M. Anbarasan, P. S. Kumar, K. Vasudevan, R. Govindan, A. Prakasam, M. Geetha, Geometrical, electronic structure, nonlinear optical and spectroscopic investigations of 4-(phenylthio) phthalonitrile dye sensitizer for solar cells using quantum chemical calculations, *Eur J Chem*, **2** (2011) 206-213.

15. R.S. Mulliken, A new electroaffinity scale; Together with data on valence states and on valence ionization potentials and electron affinities, *The Journal of Chemical Physics*, **2** (1934) 782-793.
16. K. Fukui, Theory of Orientation and Stereoselection, (1975) 34-39.
17. L. Pauling, The Nature of the Chemical Bond, Cornell University Press, Ithaca, NY, USA, (1960) 131.
18. P.W. Atkin, J. Paul, Physical Chemistry, 7th ed, University Press, Oxford, (2002).
19. D.F.V. Lewis, C. Ioannides, and D.V. Parke, —Interaction of a series of nitriles with the alcoholinducible isoform of P450: Computer analysis of structure-activity relationships, *Xenobiotica*, **24** (1994) 401-408.
20. Z. Zhou and R.G. Parr, Activation hardness: new index for describing the orientation of electrophilic aromatic substitution, *Journal of the American Chemical Society*, **112** (1990) 5720-5724.
21. Tanga, G.-D.; Zhao, J.-Y.; Li, R.-Q.; Yuan-Cao; Zhang, Z.-C. Synthesis, characteristic and theoretical investigation of the structure, electronic properties and second-order nonlinearity of salicylaldehyde Schiff base and their derivatives, *Spectrochimica Acta Part A*. **78** (2011) 449-457
22. W. Yang and R.G. Parr, Hardness, softness, and the Fukui function in the electronic theory of metals and catalysis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **20** (1985) 6723-6726.
23. R.G. Parr, L.V. Szentpaly, and S. Liu, Electrophilicity Index, *Journal of the American Chemical Society*, **9** (1999) 1922-1924.
24. P. Senet, Chemical hardnesses of atoms and molecules from frontier orbitals, *Chem. Phys. Lett.* **275** (1997) 527-532.
25. R.G. Parr, R.G. Pearson, Electronegativity and bond energy, *J. Am. Chem. Soc.* **105** (1983) 7512-7516.
26. S. Uchiyama, T. Santa, T. Fukushima, H. Homma, K. Imai, Effects of the substituent groups at the 4- and 7-positions on the fluorescence characteristics of benzofurazan compounds, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **2** (1998) 2165-2174.
27. P.J. Stephens, F.J. Devlin, C.F. Chabrowski, M.J. Frisch, Ab Initio Calculation of Vibrational Absorption and Circular Dichroism Spectra Using Density Functional Force Fields, *J. Phys. Chem.* **98** (1994) 11623-11627.
28. C. Peng, P.Y. Ayala, H.B. Schlegel, M.J. Frisch, Using redundant internal coordinates to optimize equilibrium geometries and transition states, *J. Comput. Chem.* **17** (1996) 49-56.

29. M. J. Frisch, G.W.Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman,G.Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G.A. Petersson, H.Nakatsuji, M Caricato, Li .X , H.P. Hratchian, A.F. Izmaylov, J. Bloino, G.Zheng, J.L. Sonnenberg, M.Hada, M .Ehara, Toyota, K. Fukuda R, J. Hasegawa, M.Ishida, T. Nakajima,Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J A Jr. Montgomery, J.E Peralta, F .Ogliaro, M .Bearpark,J.J. Heyd, E. Brothers, K.N. Kudin,V.N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A.Rendell, J.C. Burant, S.S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J.M. Millam, M. Klene, J.E. Knox, J.B. Cross , V.Bakken, C. Adamo , J. Jaramillo, R .Gomperts, R.E .Stratmann, O. Yazyev, Austin AJ,Cammi R,Pomelli C, Ochterski JW, Martin RL, Morokuma K, Zakrzewski VG, Voth GA, P. Salvador, J.J. Dannenberg, S. Dapprich, A.D. Daniels, Ö .Farkas, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, J.Cioslowski, D.J Fox, (2009) Gaussian 09, Revision A.02, Gaussian, Inc, Wallingford CT.
30. R.D.Dennington, T.A.Keith, J.M.Millam, Gauss View 5.0.8.Gaussian Inc. (2008).
31. P.S. Hariharan, S.P. Anthony, Substitutional group dependent colori/fluorimetric sensing of Mn^{2+} , Fe^{3+} and Zn^{2+} ions by simple Schiff base chemosensor, *Spectrochim. Acta A*.**136** (2015) 1658-1665.
32. Y. Kaya, C. Icel, V.T. Yilmaz, O. Buyukgungor, A palladium(II) complex containing both carbonyl and imine oxime ligands: Crystal structure, experimental and theoretical UV–vis, IR and NMR studies, *Spectrochimica Acta Part A*, **108** (2013) 133-140.
33. Ebrahimipour, S.Y. Abaszadeh, M. Castro, J. Seifi, Synthesis, X-ray crystal structure, DFT calculation and catalytic activity of two new oxido-vanadium (V) complexes containingONO tridentate Schiff bases, *Polyhedron*. **79** (2014) 138-150.

CHAPITRE IV

Activités anti-métallo-béta-lactamases et antibactérienne

IV.1. Activité anti-métallo-bêta-lactamases des ligands bases de Schiff

IV.1.1. Matériels biologiques et expérimentations

IV.1.1.1. Souches bactériennes

Dix souches bactériennes ont été isolées entre 2012 et 2013 à partir d'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'hôpital d'El-eulma (2 souches *Pseudomonas aeruginosa*) et de l'hôpital de Biskra (4 souches : *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens* et deux souches *Escherichia coli*). Ces souches ont été conservées dans des milieux de conservation à + 4°C jusqu'à utilisation.

IV.1.1.2. Détection phénotypique de métallo-bêta-lactamases par le test CDT

Les métallo-bêta-lactamases sont des carbapénemases qui nécessitent un ou deux ions de zinc pour leur fonctionnement catalytique d'où l'inhibition de celles-ci par l'EDTA (chélateur des cations divalents) ; cette propriété est mise à profit dans des tests de synergie. L'EDTA, mis en présence de l'imipénème, chélate le Zn indispensable à l'activité de ces enzymes les rendant inactive, et restaure ainsi l'activité de cet antibiotique ¹.

En pratique, le test CDT (Combined Disk Test Imipénème-EDTA) est réalisé selon Yong *et al* ². Des colonies bactériennes en phase de croissance ont été transférées dans des tubes contenant de l'eau physiologique pour l'obtention de suspensions bactériennes 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 boîtes de Pétri ont étéensemencées par ces suspensions par la technique d'écouvillonnage. Deux disques espacés de 25 mm contenant chacun 10 µg d'imipénème ont été appliqués sur le milieu, et une quantité de 1900 µg d'EDTA (0.5 M, pH 8) (Junsei Chemical, Tokyo, Japon) a été ajouté par la suite à l'un d'eux. Après 16 à 18 h d'incubation à 35 °C, les diamètres des zones d'inhibition de la croissance bactérienne sont notés en millimètre (mm).

IV.1.1.3. Préparation et caractérisation d'un extrait semi-purifié d'une métallo-bêta-lactamase

Un extrait semi purifié de métallo-bêta-lactamase a été préparé à partir de la souche *Acinetobacter baumannii* qui s'est avérée selon les résultats du test CDT, productrice de métallo-bêta-lactamase. Cet extrait a été par la suite caractérisé en ce qui concerne sa concentration en protéines, la classe et la sous classe de la bêta-lactamase y contenue.

a. Préparation

En pratique, 55.5 g de BHI (Brain Heart Infusion) sont rajoutés progressivement à un volume suffisant d'eau chaude pour 1.5 L. Le bouillon obtenu est répartie sur six erlen de 1L de volume à raison de 250 ml par erlen. Après stérilisation (autoclave SELECTA. P), 250 ml de bouillon sont inoculés au préalable par la souche d'*A.baumannii* puis incubée à 37°C pendant 18 h sous agitation. L'inoculum obtenu est utilisé pour ensemercer les cinq erlen restantes à raison de 50 ml d'inoculum par erlen. Après addition de 50 µg d'imipénème à chaque erlen (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 homogénéisés 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). L'homogénat obtenu est centrifugé (centrifugeuse ROTINA 35 R) à 20 000 g pendant 30 minutes à 4 °C. 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 24 h. Le dialysat, concentré par incubation avec le polyéthylène glycol, constitue notre extrait semi-purifié de métallo-bêta-lactamase et est répartie dans des tubes eppendorf à raison de 200 µl par tube puis conservé à -20°C jusqu'à utilisation. améliorée

b. Analyse quantitative des protéines

Le dosage des protéines est réalisé selon la méthode de Bradford ³ améliorée par Macart et Gerbaut ⁴ dont le principe est : en présence du réactif de bleu de Coomassie, les résidus d'acide aminés basiques (arginine, histidine,...) et hydrophobes (leucine, alanine,...) des protéines forment avec ce pigment en milieu acide un complexe qui absorbe à 595 nm, proportionnellement à la quantité de protéines existante.

Le mode opératoire consiste en l'addition à des solutions d'albumine sérique bovine (concentrations finales croissantes de 0,1 à 2 mg/ml) et à des échantillons appropriés d'extrait de bêta-lactamase semi-purifié, de 2 ml de réactif de Macart composé [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.

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

c. Détermination de la classe et sous classe de la bêta-lactamase (confirmation des résultats du test CDT)

Selon Ambler, il existe quatre classes de bêta-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 bêta-lactamases ; celle de la classe B revient essentiellement à un ou deux atome de zinc (cofacteur) d'où l'appellation métallo-bêta-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 ⁵. Ce profil inhibiteur est mis à profit pour mettre en évidence la classe de bêta-lactamase contenue dans notre extrait semi-purifié ^{6,7}.

Le mode opératoire suivi est ainsi : Dans une première étape, à des volumes suffisants pour 650 µl de tampon HEPES, nous rajoutons des concentrations croissantes d'acide clavulanique (1-50 µM) ou d'EDTA (10-100 mM). Après addition successive de 10 µl d'extrait semi purifié de bêta-lactamase à partir d'*A.baumannii* et homogénéisation manuelle, et de 80 µM (concentration finale) de céphaloridine puis une deuxième homogénéisation manuelle, l'évolution de l'absorbance des milieux réactionnels est suivie à 260 nm. Les vitesses initiales de réaction sont à chaque fois notées en ΔA/min puis converties en µmol/mg/min. Les résultats sont exprimées en IC₅₀ (la concentration inhibant 50% de l'activité enzymatique) déterminées à partir de la courbe tracée en fonction de : -Log [molécule ou ligand 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 [I(%) = (1-V-I/V+I)*100].

Dans une deuxième étape, 10 µl d'extrait semi-purifié de bêta-lactamase sont rajoutés à des volumes suffisants pour 650 µl de tampon HEPES contenant une concentration finale proche de l'IC₅₀ de l'acide clavulanique ou de l'EDTA. 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. Les vitesses initiales de

réaction sont à chaque fois notées en $\Delta A/\text{min}$ puis converties en $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$. Les valeurs des constantes de Michaelis (K_M) et des vitesses maximales (V_m 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.

d. Détermination de la sous classe de la métallo-bêta-lactamase

Nous rapellons que les MBLs qui constituent la classe B selon Ambler ou la classe 3 selon Bush, se divisent selon le profil substrat en trois sous classes : B1, B2 et B3 ou 3a, 3b et 3c.

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

En pratique nous avons procédé de la façon suivante : à des volumes suffisants pour 650 μl de tampon HEPES (50 mM ; 150 mM NaCl ; pH 7,2 ; 5 μg BSA/ml, 0.0005 % Zn), sont rajoutés des concentrations croissantes finales de pénicilline G (10-100 μM), de céphaloridine (10-80 μM), d'imipenème (5-120 μM) ou d'aztreonam (10-100 μM). Après homogénéisation, 10 μl d'extrait semi purifié de bêta-lactamase 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). Les vitesses initiales de réaction sont à chaque fois notées en $\Delta A/\text{min}$ puis converties en $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$. Les valeurs des constantes de Michaelis (K_M) et des vitesses maximales (V_m 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.

IV.1.1.4. Essais de mise en évidence d'une activité anti-métallo-bêta-lactamase par les ligands bases de Schiff H_2L^2 , H_2L^3 , H_2L^4 et H_2L^5

L'objectif de ces essais est la mise en évidence, en premier lieu, d'un éventuel effet inhibiteur de nos quatre ligands synthétisés H_2L^2 , H_2L^3 , H_2L^4 et H_2L^5 de l'activité de notre extrait enzymatique semi-purifié et en second lieu le type d'inhibition dans le cas des molécules ou ligands qui s'avèrent douer de cet effet inhibiteur.

IV.1.1.4.1. Mise en évidence d'une éventuelle activité anti-métallo-bêta-lactamase

A des volumes suffisants pour 650 μ l du même tampon HEPES, on rajoute des concentrations croissantes finales d'EDTA (1-5 mM) ou de ligands bases de Schiff **H₂L²** (1-60 μ M), **H₂L³** (1-80 μ M), **H₂L⁴** (1-100 μ M) et **H₂L⁵** (1-80 μ M) dans du DMSO/Eau (4:1 v/v). Après homogénéisation manuelle, 10 μ l d'extrait semi-purifié de métallo-bêta-lactamase à partir d'*A.baumannii* sont par la suite rajoutés. Après une deuxième homogénéisation manuelle, on rajoute 80 μ M (concentration finale) de céphaloridine et on suit l'absorbance du milieu réactionnel à 260 nm. Les vitesses initiales de réaction sont à chaque fois notées en $\Delta A/\text{min}$ puis converties en $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$. les résultats sont exprimés en IC_{50} déterminées à partir de la courbe logit-log.

IV.1.1.4.2. Mise en évidence du type de l'activité anti-métallo-bêta-lactamase

Dix microlitres de l'extrait semi-purifié de métallo-bêta-lactamase à partir d'*A.baumannii* sont rajoutés à des volumes suffisants pour 650 μ l du même tampon HEPES contenant une concentration finales proche de l' IC_{50} de **H₂L²**, **H₂L³**, **H₂L⁴** ou de **H₂L⁵**. Après homogénéisation manuelle, on rajoute de la céphaloridine à des concentrations croissantes finales de 10-80 μ M et on suit l'évolution de l'absorbance des milieux réactionnels à 260 nm. Les vitesses initiales de réaction sont à chaque fois notées en $\Delta A/\text{min}$ puis converties en $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$. Les valeurs des constantes de Michaelis (K_M') et des vitesses maximales (V_m') et des constantes d'inhibitions (K_I) 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. La constante d'inhibition K_I est égal à la vitesse maximale en présence de l'inhibiteur fois la concentration inhibant 50 % de l'activité enzymatique divisé par la vitesse maximale en absence de l'inhibiteur moins la vitesse maximale en présence de l'inhibiteur ($K_I = V_m' * [I] / (V_m - V_m')$), avec : V_m' : la vitesse maximale en présence de l'inhibiteur ; V_m : la vitesse maximale en absence de l'inhibiteur et $[I]$: l' IC_{50} de l'inhibiteur.

IV.1.2. Résultats et discussion

IV.1. 2.1. Détection phénotypique de métallo-bêta-lactamase 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 une souche clinique *Acinetobacter baumannii* par le test CDT (Combined Disk Test Imipenème-EDTA) qui consiste en l'incubation de cette dernière avec l'imipenème seul et avec l'imipenème plus EDTA. Les zones d'inhibition

obtenues suite à l'application de ce test montrent que notre souche clinique *Acinetobacter baumannii*, résiste à l'imipénème (diamètre de zone d'inhibition égale à 8 mm) et que cet antibiotique surmonte cette résistance lorsqu'on lui rajoute de l'EDTA car le diamètre de la zone d'inhibition passe de 8 mm à 15 mm soit une augmentation de presque deux fois (Figure IV.1).

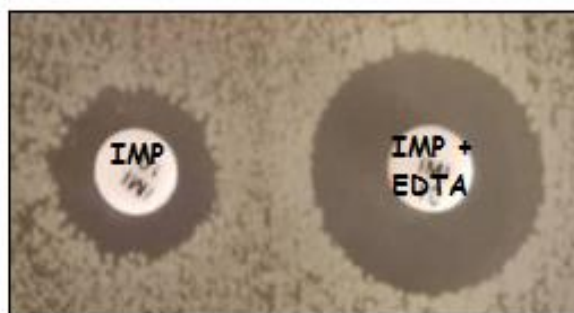


Figure IV.1. Les zones d'inhibitions de la croissance de la bactérie *A.baumannii* sur Gélose Mueller Hinton, après 16 à 18 h d'incubation en présence d'imipénème seul (10 µg) et d'imipénème (10 µg) plus EDTA (1900 µg). IMP = Imipénème.

Expérimentalement, différentes méthodes sont recommandées pour la détection phénotypique des MBLs. Celles-ci incluent les tests MHT (Test de Hodge modifié) ⁸, DDST (Imipenem-EDTA double disc synergy test), CDT (Imipenem-EDTA combined disc test), MBL E-test (métallo-bêta-lactamase E-Test) ^{9,10}. Dans ces tests on suit l'effet de L'EDTA sur le diamètre des zones d'inhibition de la croissance bactérienne sur milieux solides par les carbapénèmes seuls. Parija et ses collaborateurs ¹¹, en cherchant des souches *P.aeruginosa* productrices de MBLs par le test CDT et 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 de l'EDTA sur les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de la croissance bactérienne en milieux liquides manifestes par les carbapénèmes seuls ⁹.

De nombreux travaux sur la détection phénotypique de MBLs ont montré que les isolats cliniques de souches bactériennes appartiennent généralement aux genres ¹²⁻¹⁴ *Acinetobacter* et *Pseudomonas*, plus particulièrement, aux espèces *A.baumannii* et *P.aeruginosa*, dans l'ordre ¹⁵⁻¹⁷.

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 une souche seulement *A.baumannii* est résistante à l'imipénème (diamètres confondus de zone d'inhibition inférieur à 10 mm) et productrice de MBLs (diamètres confondus de zone d'inhibition en présence d'EDTA supérieur à 15, soit une augmentation de plus de 7 mm) ^{10, 18}.

IV.1.2.2. Caractérisation de l'extrait semi-purifié d'une métallo-bêta-lactamase

a. Analyse quantitative des protéines

Un extrait semi-purifié de métallo-bêta-lactamase a été obtenu à partir d'homogénat (extrait brut) de culots cellulaires bactériens d'un isolat clinique : *A.baumannii*, ceci suite à un traitement par la streptomycine, une centrifugation, une dialyse puis une concentration de cet extrait brut.

La teneur en protéines exprimée en mg/ml est déterminée par la méthode de Bradford améliorée par Macart et Gerbaut ⁴ qui consiste en l'incubation d'échantillon d'extrait et du standard (BSA) avec le réactif de Macart, puis en la lecture de l'absorbance du mélange à 595 nm. La teneur est déterminée à partir de l'équation de la courbe tracée en fonction des concentrations de la BSA et les absorbances relatives. Dans notre cas celle-ci (Figure IV.2) ne passe pas par l'origine (**b = 0.026**) mais elle est presque linéaire dans l'intervalle de concentration du standard rapporté (**R² = 0,9975**). L'application de l'équation de cette courbe a montrée que la teneur en protéines de notre extrait enzymatique est de l'ordre de 7.9 mg /ml.

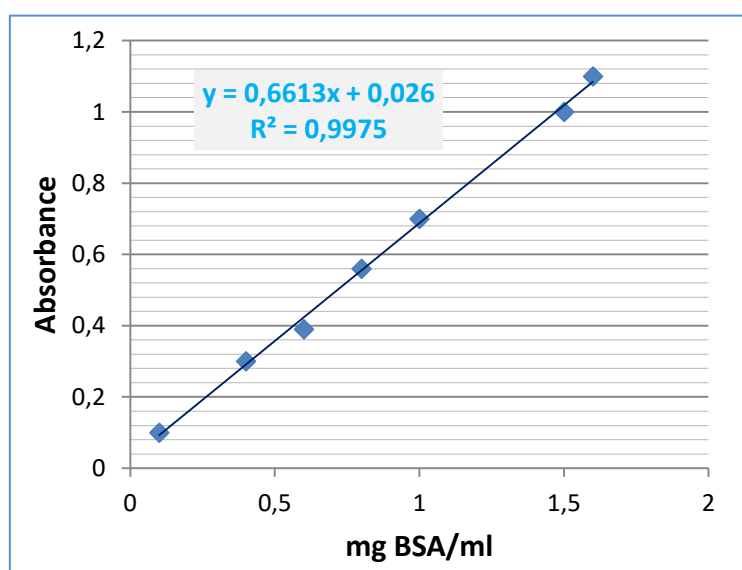


Figure IV.2. Courbe d'étalonnage tracée en fonction de concentration croissante de BSA et les absorbances relatives à 595 nm (Moyenne \pm SD de trois mesures).

Faute d'équipement de lyophilisation, il n'était pas possible pour nous de calculer un rendement ou un taux de protéine dans notre extrait semi-purifié de métallo-bêta-lactamase et faire des recoupements avec des données bibliographiques. Nous nous sommes limités en conséquent à un simple dosage de protéines y existantes et à un calcul de la concentration relative. Celle-ci était de l'ordre de 7.9 mg/ml d'extrait enzymatique, une concentration que nous estimons suffisante pour engendrer une activité enzymatique mesurable (figure IV.3).

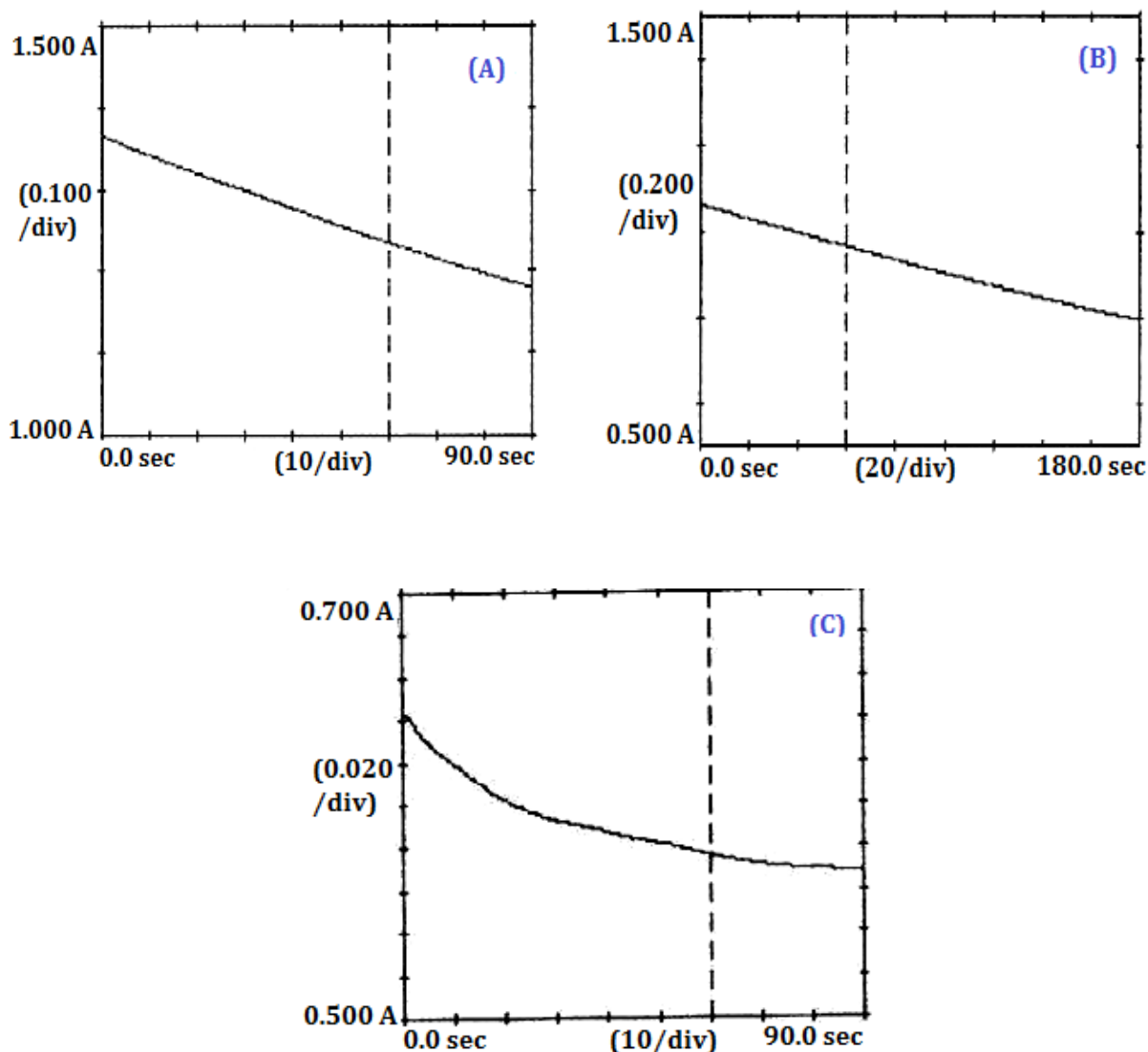


Figure IV.3. Evolution de l'absorbance de (A) 80 μM céphaloridine ; (B) 100 μM penicilline et (C) 120 μM imipenème en présence de 10 μl d'extrait semi-purifié de MBL à partir de *A.baumannii* .

b. Détermination de la classe de bêta-lactamase (confirmation des résultats du test CDT)

Après mise en présence de concentrations fixes d'acide clavulanique ou d'EDTA avec 10 μl 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 (Figure.IV.4), les valeurs de la constante de Michaelis-Menten (K_M) déterminées sont 15.38 et 28.98 μM ; celles des vitesses maximales sont 134.13 et 129.52 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protéine/min, respectivement en présence de l'acide clavulanique et de l'EDTA (Tableau. IV.1).

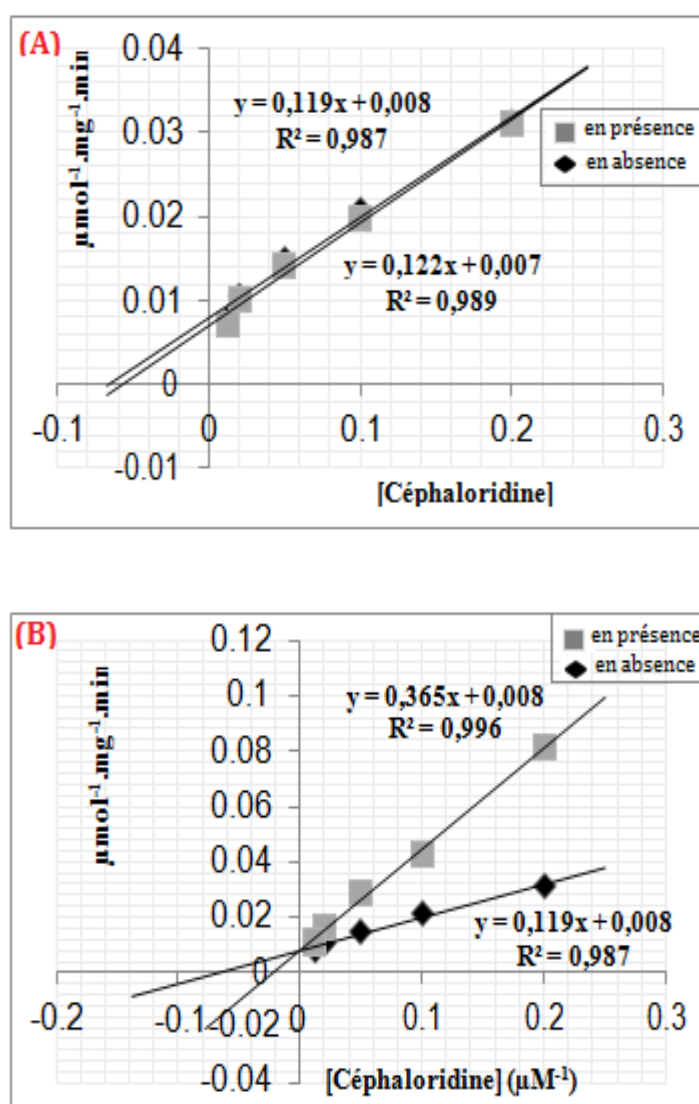


Figure IV.4. Courbes de lineweaver-burk tracées en fonction de l'inverse des vitesses d'hydrolyses de concentrations micro-molaires finales croissantes de Céphaloridine par l'extrait semi purifié à partir de *A.baumannii* : en présence et en absence de concentrations fixes d'acide clavulanique (A) et d'EDTA (B).

Tableau IV.1. Valeurs des K_M et des V_m d'hydrolyses de concentrations micro-molaires croissantes finales de céphaloridine par 10 μ l d'extrait semi-purifié de métallo-bêta-lactamase à partir d' *A.baumannii* en présence de concentration fixes d'acide clavulanique ou d'EDTA.

<i>Molécules</i>	<i>Paramètres cinétiques</i>	
	V_m (μ mol/mg/min)	K_M (μ M)
Aucune	116.3	14.06
+ Ac.Clavulanique	134.13	15.38
+ EDTA	129.52	28.98

La comparaison de nos résultats relatifs aux tests d'hydrolyses de céphaloridine par l'extrait semi purifié de bêta-lactamase à partir d'*A.baumannii* en absence et en présence de l'acide clavulanique, montre que les valeurs de K_M (14.06 et 15.38 μ M, respectivement) et de V_m (116.3 ; 134.13 μ mol/mg/min, respectivement) sont presque les mêmes. La même comparaison mais en absence et en présence de l'EDTA, montre que les valeurs de V_m (116.3 ; 129.52 μ mol/mg/min, respectivement) sont proches alors que celles de K_M (14.06 et 28.98 μ M, respectivement) sont nettement différents. Ces deux comparaisons confondues montrent que la bêta-lactamase de cet extrait semi purifié 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 s'agit d'une bêta-lactamase de la classe B ou la classe 3 autrement dit de type MBL.

Nous signalons que de nombreux auteurs qualifient *A.baumannii* comme étant un réservoir de carbapénemases ¹⁹ et de MBLs ^{20,21}.

c. Détermination de la sous classe de bêta-lactamase

Après mise en présence de concentrations croissantes de différents antibiotiques substrats avec 10 μ l d'extrait semi-purifié à partir de *A.baumannii* et conversion des vitesses d'hydrolyse relatives de ces substrats, une représentation graphique de Lineweaver-burk est réalisée ($1/V = f(1/[S])$) (Figure IV.5). Les valeurs de la constante de Michaelis-Menten (K_M) déterminées à partir de l'équation de cette représentation sont 14.92; 14.06 ; 57.52 μ M, celles des vitesses maximales sont 80.64 ; 116.3 ; 47.62 μ mol/mg protéine/min, respectivement dans le cas de la pénicilline G, de la céphaloridine et de l'imipénème (Tableau. IV.2).

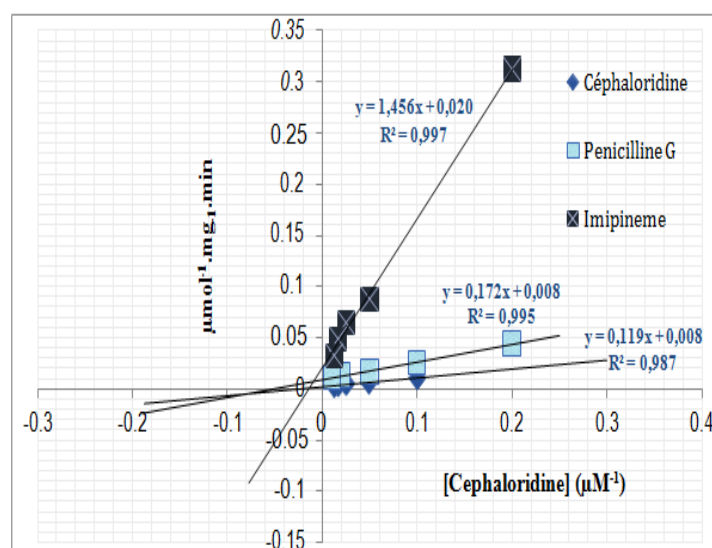


Figure IV.5. Courbe de lineweaver-burk tracée en fonction de l'inverse des vitesses d'hydrolyses de concentrations micro-molaire finales croissantes de pénicilline G, de céphaloridine et d'imipénème par l'extrait semi-purifié à partir de *A.baumannii* et l'inverse de concentrations de ces antibiotiques.

Tableau IV.2. Paramètres cinétiques des métallo-bêta-lactamases avec des antibiotiques bêta-lactames.

Classe	substrats	λ_{max} (nm)	K_M (μM)	Activité spécifique ¹ (V_m)	Efficacité de l'hydrolyse ² (K_m)
Penem	Penicilline G	235	14.92 ± 0.00888	80.64 ± 1.147	5.40 ± 0.036
Cephem	Cephaloridine	260	14.06 ± 0.009	116.3 ± 2.036	8.80 ± 0.014
Carbapenem	Impénème	299	47.62 ± 0.012	52.57 ± 0.973	1.10 ± 0.002
Monobactam	Aztreonam	320	∞	0	0

¹ μmol de substrat hydrolysé par mn et par mg de protéine ($\mu mol \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$),

² $\mu mol \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1} / K_m$, les résultats exprimés en mean \pm SD ($n = 4$).

Les résultats obtenus suite aux tests d'hydrolyse de la pénicilline G, de la céphaloridine, de l'imipénème ou de l'aztreonam ont montré que l'extrait semi-purifié de *A.baumannii* interagit avec tous les antibiotiques y compris l'imipénème à l'exception de l'aztreonam à des K_M de 14.92 ; 14.06 ; 47.62 μM et les dégradent à des vitesses de 80.64 ; 116.3 ; 52.57 $\mu mol/mg$ protéine/min, respectivement. L'interaction avec l'imipénème et son hydrolyse reflètent que la bêta-lactamase y existante 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_M) et du paramètre quantitatif de la vitesse d'hydrolyse (V_m) de la céphaloridine avec ceux de la pénicilline G et de l'imipénème reflètent que cette MBL est une MBL céphalosporinase autrement dit appartenant à la sous classe 3c²²⁻²⁴.

IV.1.2.3. Mise en évidence d'une activité anti-métallo-bêta-lactamase

Les tests préliminaires d'inhibition, montrent que nos ligands sont tous efficace sur l'activité de notre extrait enzymatique de métallo-bêta-lactamases (figureIV.6).

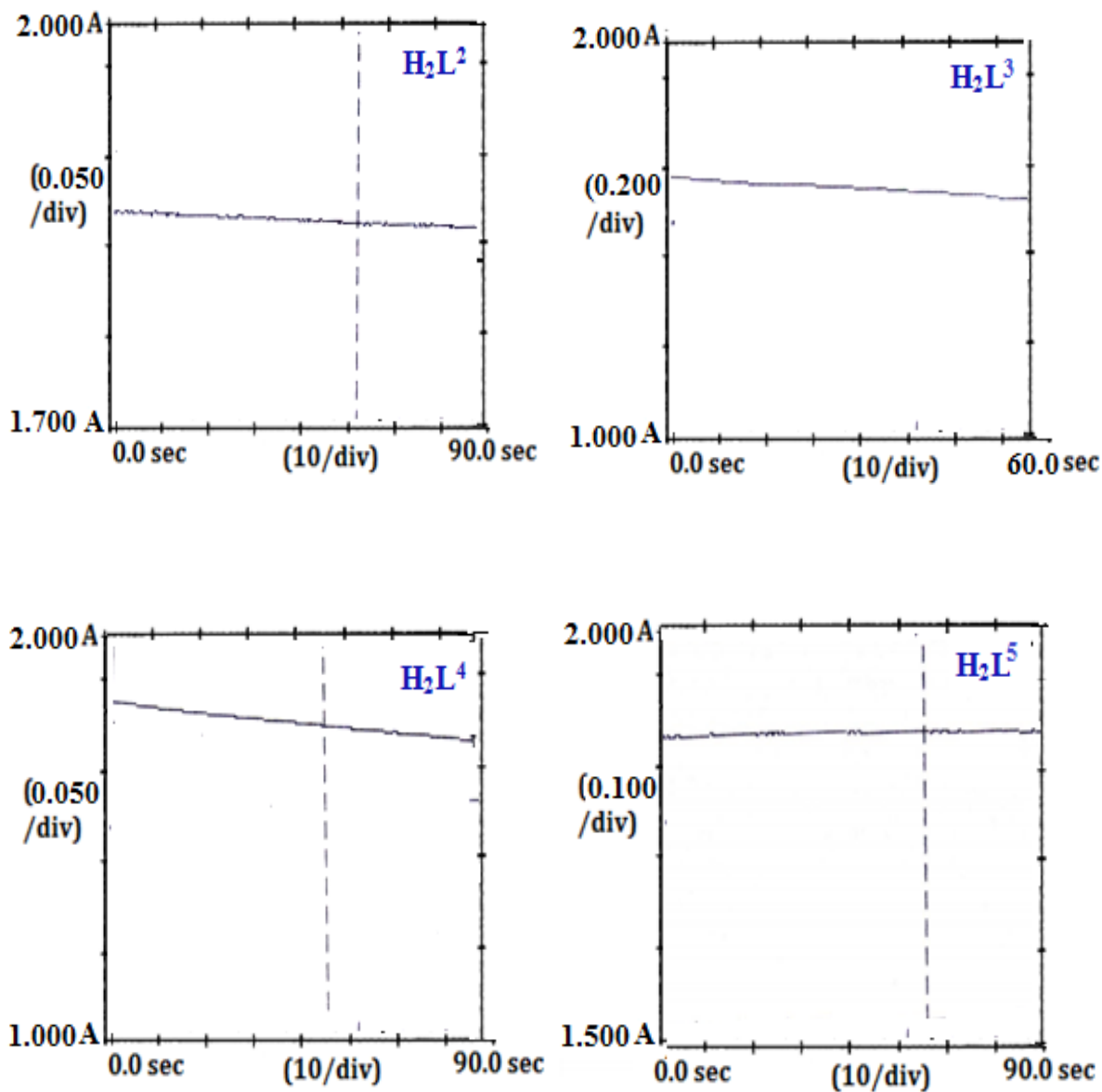


Figure IV.6. Evolution de l'absorbance de 75 μM H_2L^2 ; de 150 μM H_2L^3 , de 200 μM H_2L^4 et de 150 μM H_2L^5 en présence de 80 μM de céphaloridine et de 10 μl d'extrait semi-purifié de MBL à partir de *A. baumannii* .

L'évaluation de cet effet a été quantifiée par détermination de l'IC₅₀ qui se définit comme étant la concentration de l'inhibiteur nécessaire pour inhiber 50 % de l'activité de notre extrait d'MBL. Nous avons opéré à température ambiante dans 650 µL de tampon HEPES après incubation de 10 µL d'extrait enzymatique avec des concentrations croissantes d'EDTA, de **H₂L²**, de **H₂L³**, de **H₂L⁴** ou de **H₂L⁵** et initiation de la réaction avec la céphaloridine.

Les courbes de saturation obtenues montrent que nos ligands base de Schiff inhibent d'une façon dose – dépendante l'activité hydrolytique de notre extrait enzymatique (Figure IV.7). Les valeurs des IC₅₀ calculées à partir des courbes logit-log (Figure IV.8) sont respectivement : 3.98 mM, 33.35 ± 1.00, 43.98 ± 1,00, 58.96 ± 1,74 et 40.03 ± 1.00 µM (Tableau IV.3). Ces valeurs montrent que ces inhibitions sont toutes significatives par comparaison à l'inhibiteur classique, l'EDTA (Figure IV.9).

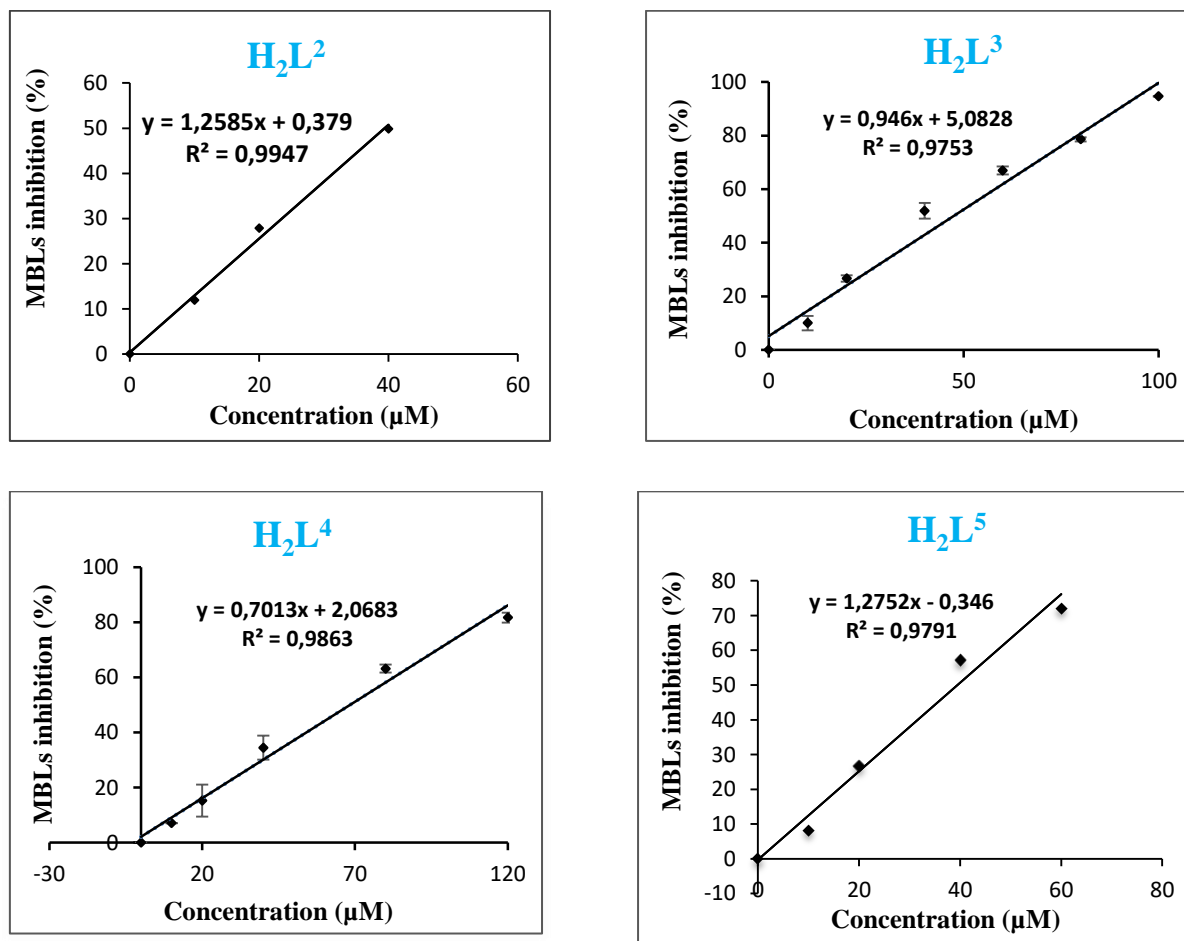


Figure IV. 7. Courbes de saturation tracées en fonction de concentrations croissantes de ligands base de Schiff et des pourcentages d'inhibition de l'extrait semi-purifié de MBL.

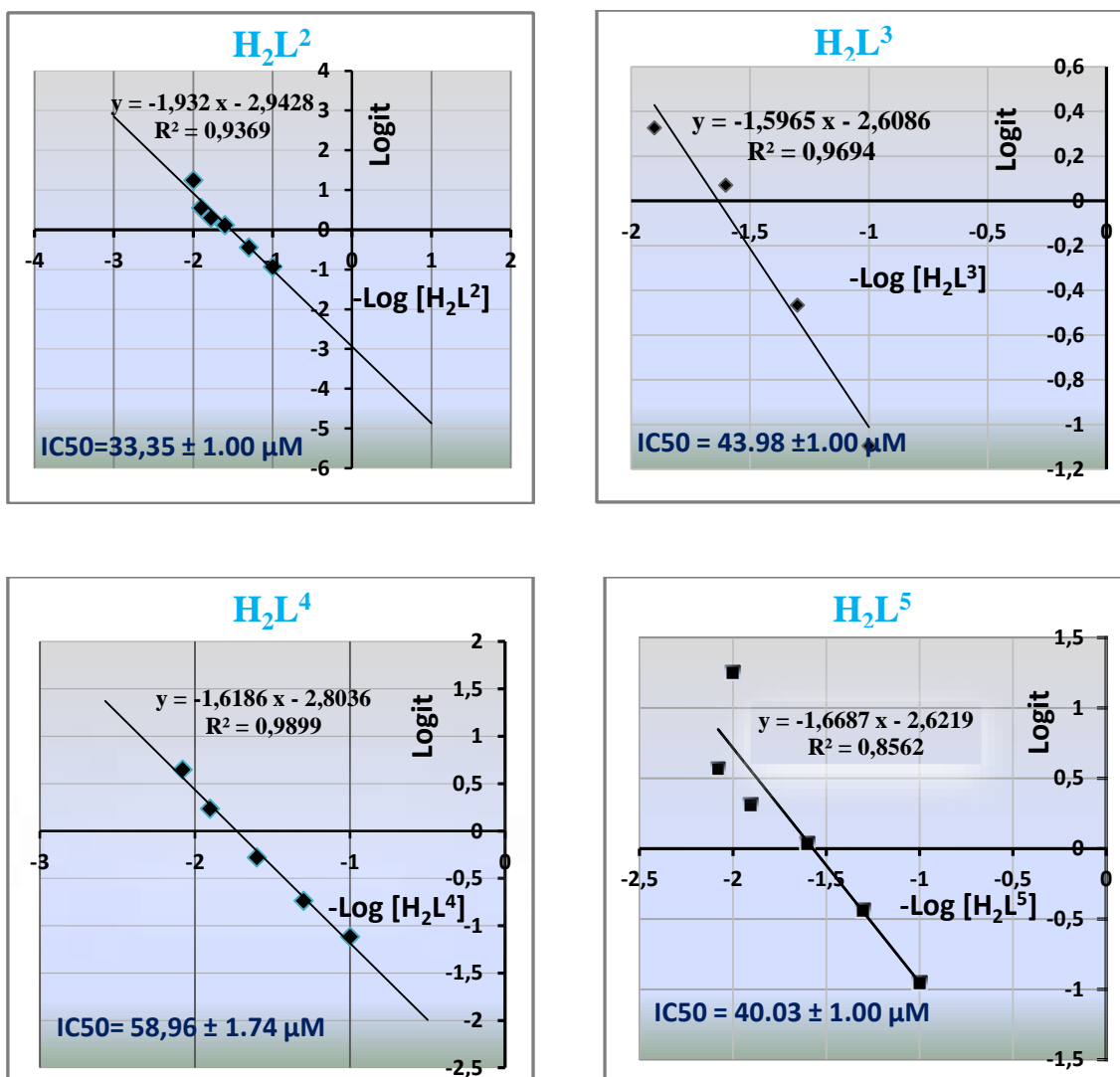


Figure IV.8. Les valeurs de concentration inhibant 50% (IC₅₀) de l'activité de l'extrait semi-purifié de bêta-lactamases à partir d'*A.baumannii* et courbes Logit-Log dans le cas de H₂L², H₂L³, H₂L⁴ et H₂L⁵.

Tableau IV.3. Les valeurs IC₅₀ des ligands base de Schiff et de l'EDTA inhibant 50% de l'activité de l'extrait semi-purifié de MBL.

Composés	Interval de Concentration testée	IC ₅₀
EDTA	1μM -5 mM	3.98 mM
H ₂ L ²	1-60 μM	33.35 ± 1,00 μM
H ₂ L ³	1-80 μM	43.98 ± 1,00 μM
H ₂ L ⁴	1-100 μM	58.96 ± 1,74 μM
H ₂ L ⁵	1-80 μM	40.03 ± 1,00 μM

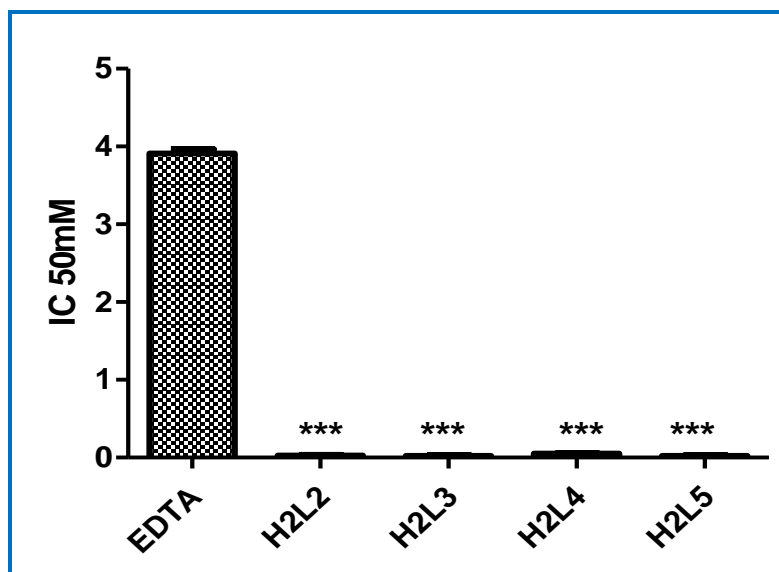


Figure IV.9 . Les valeurs d'IC₅₀ de ligands H₂L², H₂L³, H₂L⁴, H₂L⁵ et de l'EDTA de l'activité de l'extrait semi-purifié de bêta-lactamases. Les résultats exprimés en moyennes ± écart-type (n = 3). Signification statistique de la différence par rapport aux valeurs correspondantes des incubations de contrôle: *** P < 0,001.

Selon la littérature, les agents chélateurs, y compris les bases de Schiff sont utilisées entre autres soit comme agents antimicrobiens contre les bactéries produisant des bêta-lactamases ou non ^{25, 26} soit comme inhibiteurs des sérines bêta-lactamases (SBL) ²⁷ ou de MBLs ²⁸. Dans ce cas dernier, l'effet inhibiteur est souvent quantifié par le pourcentage d'inhibition ²⁹ par détermination de K_I ³⁰ ou du paramètre IC₅₀. Faridoun et Nazar UI Islam ³¹ dans leur article revue, ont rapporté les inhibiteurs de MBLs investigués jusqu'au l'an 2013 avec leurs IC₅₀. Dans le cas des dérivés de thiol, les valeurs de leurs IC₅₀ varient de 0,4 nM à 1µM. Dans le cas de certains biphenyltétrazoles et leurs substitués, les valeurs de ce paramètre varient de 0,3 à 860 µM. Récemment, Anne Makena et ses collaborateurs (2015) ont comparés les effets inhibiteurs de l'activité de variants d'une métallo-bêta-lactamase du type VIM (Verona Imipenémase) de composés contenant différents métaux chélateurs ³² et ont constaté que leurs IC₅₀ varient entre 1 mM et 2 µM.

La comparaison de nos résultats avec ces données de littérature montre que les valeurs d'IC₅₀ obtenues dans le cas de nos ligands synthétisés, se situent dans les mêmes intervalles de valeurs y rapportés.

IV.1.2.4. Mise en évidence du type de l'activité anti-métallo-bêta-lactamase

Après mise en présence de concentrations fixes proche des IC_{50} de H_2L^2 , de H_2L^3 , de H_2L^4 ou de H_2L^5 avec 10 μ l d'extrait semi-purifié à partir d'*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 (Figure IV.10), les valeurs de K_M' déterminées sont 5.5, 7.26, 6.89 et 4.49 μ M ; celles de V_m' sont 52.08, 58.82, 58.37 et 42.37 μ mol/mg protéine/min, respectivement dans le cas de H_2L^2 , de H_2L^3 , de H_2L^4 ou de H_2L^5 (Tableau IV.4). Ces valeurs sont différentes de celles obtenues avec la céphaloridine seule ($K_m = 14.06 \mu$ M, $V_m = 116.3 \mu$ mol/mg protéine/min), montrant que nos quatre ligands bases de Schiff inhibent d'une façon incompétitive ^{33,34} l'activité de l'extrait enzymatique en question. Les valeurs de K_I déterminées sont 15.64, 46.95, 56.65 et 25.72 μ M, dans l'ordre, montrant que l'intensité d'inhibition est relative ; l'ordre de l'efficacité croissant d'inhibition est : $H_2L^2 > H_2L^5 > H_2L^3 > H_2L^4$.

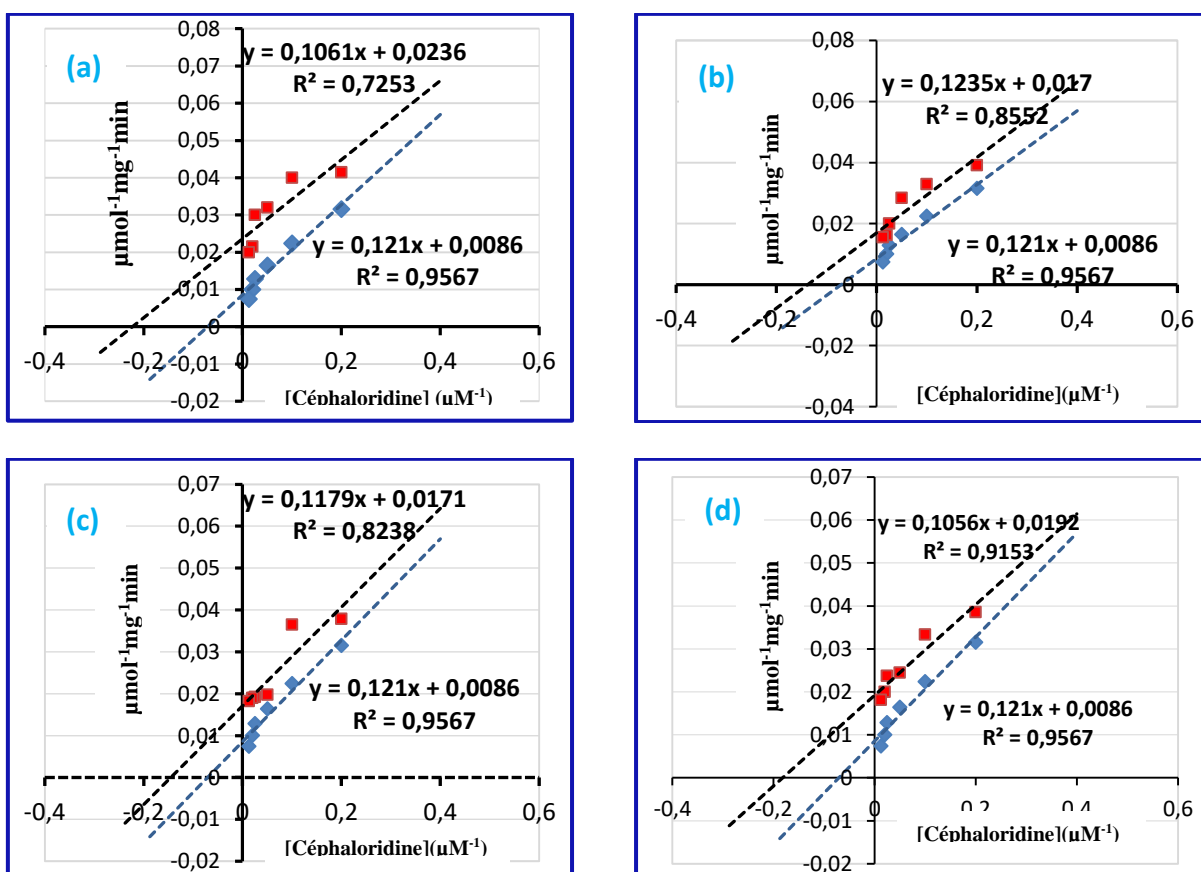


Figure. IV.10. Courbes de lineweaver-burk tracées en fonction de l'inverse des vitesses d'hydrolyses de concentrations micro-molaire finales croissantes de céphaloridine par l'extrait semi-purifié de *A.baumannii*, en absence (♦) et en présence (■) de concentrations fixes de H_2L^2 (a), de H_2L^3 (b), de H_2L^3 (c), ou de H_2L^4 (d) et l'inverse des concentrations de céphaloridine.

Tableau. IV.4. Les valeurs de K_M (μM), K_I (μM) et des V_m ($\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$) d'hydrolyse de concentrations croissantes de céphaloridine par 10 μl d'extrait semi-purifié à partir de *A.baumannii* en absence et en présence de l'IC₅₀ de H₂L², de H₂L³, de H₂L⁴, ou de H₂L⁵.

<i>Molécules</i>	<i>Paramètres cinétiques</i>		
	V_m ($\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$)	K_M (μM)	K_I (μM)
Céphaloridine seule	116.3	14.06	
Céphaloridine en présence d'IC ₅₀ de			
H ₂ L ²	42.37	4.49	15.64
H ₂ L ³	58.82	7.26	46.95
H ₂ L ⁴	58.37	6.89	56.65
H ₂ L ⁵	52.08	5.5	25.72

IV.2. Activité antibactérienne des ligands bases de Schiff H₂L et leurs complexes de zinc Zn(II)L

IV.2.1. Matériels et expérimentations

IV.2.1.1. Souches bactériennes testées

Pour mettre en évidence une éventuelle activité antibactérienne de nos ligands bases de Schiff et de leurs complexes de zinc synthétisés, un total de huit souches bactériennes est utilisé (Tableau IV.5). Les huit souches ont été repiquées dans des tubes de gélose de conservation inclinée puis incubés à 37 °C pendant 24 h. Au terme de cette incubation, ces tubes sont conservés à 4 C° jusqu'à utilisation.

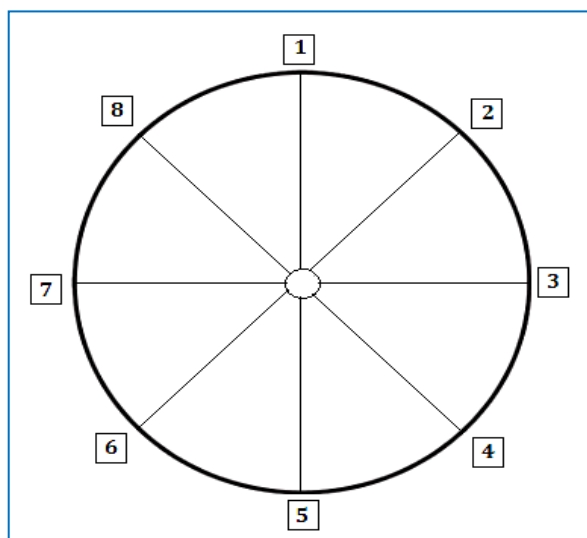
Tableau IV.5. Les souches bactériennes utilisées.

Le Gram	La souche
Gram⁻	<i>E. coli</i> ATCC 25922
	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603
	<i>K. pneumoniae</i> carb 90
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
	<i>A. baumannii</i> MBL
	<i>E. coli</i> BLSE
Gram⁺	<i>S.aureus</i> ATCC 25923
	MRSA

IV.2.1.2. Test de sélectivité

Il s'agit en fait d'une étude du spectre d'activité antibactérienne dont l'objectif est la détection de la ou les souches bactériennes dont la croissance est sensible à nos ligands et à leurs complexes de zinc.

En pratique, un inoculum de chaque souche est préparé par inoculation de 15 ml de BHI et incubation pendant 24 h à 37 C°. Les inoculum obtenus sont standardisés à 0.5 McF correspondant à $1-2 \times 10^8$ UFC/ml (0,08 - 0,1 mesurée à 630 nm). A l'aide d'écouvillon, un ensemencement a été pratiqué sur une surface de milieu Mueller Hinton (MH) coulé préalablement dans des boîtes de Pétri. L'ensemencement est fait sous forme de lignes venant de la bordure de la boîte vers son centre au niveau duquel un disque de papier Wattman est appliqué ceci après stérilisation et imprégnation par 10 µL de chacune des solutions de nos produits synthétisés (10 mg/ml). Chaque ligne correspond à une souche (Figure IV.11). Un témoin négatif à l'aide de milieu BHI est réalisé. Après ensemencement, les boîtes sont incubées pendant 24 h à 37 C°. Les résultats sont exprimés par la distance d'inhibition par millimètres.



- | | |
|-------------------------------------|---|
| 1. <i>E. coli</i> ATCC 25922 | 5. <i>S. aureus</i> ATCC 25923 |
| 2. <i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603 | 6. <i>A. baumannii</i> MBL |
| 3. <i>K. pneumoniae</i> carba 90 | 7. <i>S. aureus</i> résistant à la méticilline (MRSA) |
| 4. <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 | 8. <i>E. coli</i> BLSE |

Figure IV.11. Test de sélectivité.

IV.2.1.3. Test de diffusion de disque

Le test de diffusion de disque ressemble le test d'antibiogramme avec substitution du disque de l'antibiotique par un disque de papier Wattman chargé de molécule à tester. Son objectif est la confirmation des résultats du test de sélectivité obtenus dans le cas de notre souche bactérienne *A.baumannii* qui a servi de source d'extraction de MBLs : Chacun des ligands bases de Schiff et leurs complexes de zinc est solubilisé dans du DMSO à une concentration finale de 10 mg/ml. Des volumes de 15 ml de gélose Mueller Hinton en surfusion sont coulés dans des boîtes de Pétri. Après refroidissement et solidification à température ambiante, 100 µl de suspension d'*A.baumannii* préparée à partir de culture jeune, sont étalés à l'aide d'écouvillon sur la surface du milieu gélosé. Puis avec une pince stérile, des disques de papier wattman 6 mm environ sont déposés sur la surface après imprégnation avec 10 µl de solution de ligand ou de complexe. Les boîtes sont fermées puis mises à l'étuve à température de 37°C pendant 24 heures. Les résultats sont exprimés en mm de diamètres des zones d'inhibition. La souche est considérée non sensible (-) ou résistante si le diamètre est inférieur à 8 mm, sensible (+) si le diamètre compris entre 9 à 14 mm et très sensible (++) si le diamètre compris entre 15 à 19 mm.

IV.2.2. Résultat et discussion

Dans le but de connaître le spectre d'activité de nos ligands bases de Schiff et de leurs complexes de zinc, un test de sélectivité a été réalisé sur huit souches bactériennes (Figure IV.12) suivi par un test de diffusion sur disque sur la souche *A.baumannii* MBL (Figure IV.13). Le tableau IV.6 rapporte les résultats de test de sélectivité. Le tableau IV.7 rapporte les résultats de test de diffusion sur disque.

Selon les résultats obtenus et souches confondues, le ligand H_2L^2 et son complexe de zinc et le ligand H_2L^5 n'ont aucune activité antibactérienne ni sur les souches Gram⁺ ni sur les souches Gram⁻ testés. A l'exception du complexe Zn(II)L^5 , les ligands H_2L^3 , H_2L^4 et leurs complexes agissent uniquement sur les souches bactériennes Gram⁺. Parmi ceux-ci, le ligand H_2L^3 et son complexe Zn(II)L^3 agissent plus efficacement.

Dans le cas de la souche *A.baumannii* productrice d'MBL, sa croissance s'est révélée relativement inhibée par le complexe Zn(II)L^5 .

L'insensibilité de la croissance de nos souches bactériennes Gram⁻ à la majorité de nos ligands et leurs complexes semble être due à leur paroi bactérienne qui, plus développée, limite la pénétration de la molécule dans la cellule bactérienne et par conséquent son action bactériostatique ou bactéricide ³⁵.



Figure IV.12. Test de sélectivité des ligands H_2L et leurs complexes $Zn(II)L$.

Tableau IV.6. Effet de différents ligands bases de Schiff et leurs complexes sur la croissance des souches bactériennes testées.

Composé		H ₂ L ²	Zn(II)L ²	H ₂ L ³	Zn(II)L ³	H ₂ L ⁴	Zn(II)L ⁴	H ₂ L ⁵	Zn(II)L ⁵
Souche	Gram								
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	-	-	+	+	-	+	-	+
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>K. pneumoniae</i> carb 90	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. baumannii</i> MBL	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>E. coli</i> BLSE	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	+	-	-	+++	++++	+	+	-	+
MRSA	+	-	-	++	++	+	+	-	+
Controle négatif BHI	/	/	/	/	/	/	/	/	/

Selon les résultats obtenus suite au test de diffusion de disque sur *A.baumannii* MBL, la croissance de celle-ci s'est révélée relativement sensible au complexe **Zn(II)L⁵** (diamètre de zone d'inhibition légèrement supérieur à 8 mm). Confirmant ainsi les résultats de test de sélectivité.

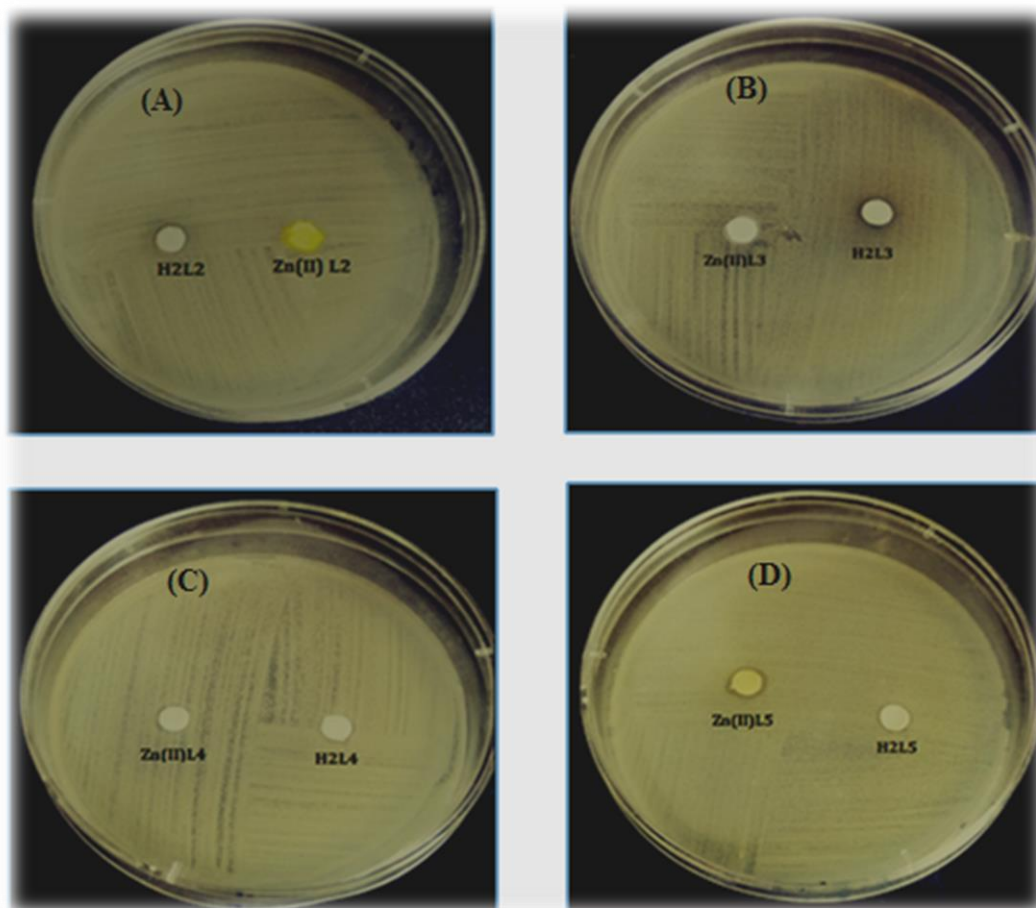


Figure IV.13. Les zones d'inhibitions de la croissance de la bactérie *Acinetobacter baumannii* sur Gélose Mueller Hinton, après 24 h d'incubation en présence des ligands H_2L^2 (A), H_2L^3 (B), H_2L^4 (C) et H_2L^5 (D) et de leurs complexes $Zn(II)L$ correspondants.

Tableau IV.7. Diamètre des zones d'inhibition des ligands H_2L et leurs complexes $Zn(II)L$.

Ligand	Diamètre d'inhibition (mm)	Complexe	Diamètre d'inhibition (mm)
H_2L^2	06	$Zn(II)L^2$	05
H_2L^3	07	$Zn(II)L^3$	08
H_2L^4	05	$Zn(II)L^4$	05
H_2L^5	06	$Zn(II)L^5$	07

References bibliographiques

1. N. Aggoune-khinache, D. Bensersa, F.Z. Henniche, M. Daoudi, M.A. Abdouni, A. Chabani, D. Tiouit, M. Naim, Metallo-betalactamases producing *Pseudomonas aeruginosa* in Algeria, *Médecine et maladies infectieuses*. **39** (2009) 413–414.
2. D. Yong, K. Lee, J.H. Yum, H.B. Shin, G.M. Rossolini, Y. Chong, Imipenem EDTA Disk Method for Differentiation of Metallo-beta-Lactamase-Producing Clinical Isolates of *Pseudomonas spp.* and *Acinetobacter spp.*, *J. clin .microbiol.* **40** (2002) 3798–3801.
3. M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle Protein-Dye Binding, *Anal. Biochem.* **72** (1976) 248-254.
4. M. Macart, L. Gerbaut, An improvement of the coomassie blue dye binding method allowing an equal sensitivity to various proteins application to cerebrospinal fluid, *Clin Chem Acta*, **122** (1982) 93-101.
5. L. Poirel, P. Nordmann, Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes, *Clin Microbiol Infect*, **8** (2002) 321-331.
6. R.P. Ambler, The structure of b-lactamases, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **289** (1980) 321–331.
7. V. Gautier, Caractérisation et expression des gènes codant pour les β -lactamases chromosomiques au sein des entérobactéries de l'environnement. Thèse de doctorat. *École pratique des hautes études*, (2007).
8. Z.S. AlSehlawi, A.M. Almohana, A.A. AlThahab, Occurrence and detection of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumonia* clinical isolates in Najaf Hospital. *Magazin of Al-Kufa University for biology*, **5** (2) (2013).
9. V. Hemalatha, U. Sekar, V. Kamat, Detection of metallo betalactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in hospitalized patients, *Indian J Med Res.* **122** (2005) 148-152.
10. M. Shanmugam, Detection of metallo-betalactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in hospitalized patients at VIMS, Bellary. Departement of microbiology Vijayanagar Institute of Medical Sciences, Bellary. *A dissertation for the degree of Doctor of medicine in microbiology*, (2013) 114.
11. S.C. Parija, M.J.C. Noyal, G.A. Menezes, B.N. Harish, S. Sujatha, Simple screening tests for detection of carbapenems in clinical isolates of gram-negative bacteria, *Indian J Med Res*, **129** (2009) 707-712.
12. P.A. Crawford, N. Sharma, S. Chandrasekar, T. Sigdel, T.R. Walsh, J. Spencer, M.W. Crowdera, Over- expression, purification, and characterization of metallo- β -lactamase ImiS from *Aeromonas veronii* Bv. Sobria, *Protein Expression and Purification*, **36** (2004). 272–279.
13. U. Altoparlak, F. Aktas, D. Celebi, Z. Ozkurt, M.N. Akcay, 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** (2005) 707–710.
14. S.B. Prajapati, S.G. Oza, S.J.Mehta, M.M.Vegad, Prevalence of Metallo-betalactamase producing *Pseudomonas* Spp. (In Tertiary Care Hospital), *NJIRM*, **2** (2013). 68-70.
 15. A.P. Zavascki, L.Z. Goldani, A.L.S. Gonçalves, A.F.Martins, A.L. Barthn, High prevalence of metallo-beta-lactamase-mediated resistance challenging antimicrobial therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian teaching hospital. *Epidemiol. Infect.* **135** (2007) 343-345.
 16. A.K. Santosh, T. Nilima, Prevalence and Antimicrobial Susceptibility Profile of Metallo-B-Lactamases (M-B-L) Producing *Pseudomonas Aeruginosa* from Rural Hospital: Comparison of Two Disk Diffusion Methods.*International Journal of Basic and Applied Medical Sciences*, (2011).
 17. H.R.Ahir, P.H. Patel, R.A. Berry, R. Parmar, S.T. Soni, P.K. Shah, M.M. Vegad, S.Patil, Prevalence Of Metallo- B-Lactamases Producing *Pseudomonas* And *Acinetobacter* Species In Tertiary Care Teaching Hospital, Gujarat. *International Journal of Microbiology Research*. **4** (2012) 322-325.
 18. Y. Khosravi, M.F. Loke, E.G. Chua, S.T.Tay, J.Vadivelun, Phenotypic Detection of Metallo- β -Lactamase in Imipenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *The Scientific World Journal*, **7** (2012) 639-954.
 19. S. Figueiredo, *Acinetobacter spp* et réservoir de gènes de carbapénèmases. *Thèse de Doctorat, discipline, Bactériologie*, (2011).
 20. M.Drissi, L.Poirel, P.D. Mugnier, Z. Baba Ahmed, P. Nordmann, Carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii*, Algeria. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, **29** (2010) 1457-1458.
 21. S. John, B.Ramasamy, Bioprospection of marine *Streptomyces* sp for its antagonistic activity on MDR *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolates, *Asian Pac J Trop Dis*, **4** (2014) 290-296.
 22. B.A.Rasmussen, K. Bush, Carbapenem-hydrolyzing β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*; **41** (1997) 223 -232.
 23. N.P. harma, Structure/function studies on metallo- β -lactamase ImiS FROM *Aeromonas Bv. Sobria*. These de doctorat en physiologie, Miami university,oxford, Ohio, (2007).
 24. V. Guptan, Metallo beta lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species Expert Opin. *Investig. Drugs*. **17** (2008) 131-143.
 25. R.M. Christoff, G.L. Murray, X.P. Kostoulis, A.Y. Peleg, B.M. Abbott, Synthesis of novel 1,2,5-oxadiazoles and evaluation of action against *Acinetobacter baumannii*, *Bioorg. Med. Chem.* **25** (2017) 6267- 6272.
 26. O. Özdemir, P. Gürkan, B. Özçelik, O. Oyard, Synthesis and antimicrobial activities of new higher amino acid Schiff base derivatives of 6- aminopenicillanic acid and 7- aminocephalosporanic acid, *J. Mol. Struct.* **1106** (2016) 181-191.

27. S.S. Karki, A.A. Kulkarni, S. Thota, S. Nikam, A.S. Kamble, N.D. Dhawale, Synthesis, antimicrobial screening and beta lactamase inhibitory activity of 3-(3-chloro-4-fluorophenylimino) indolin-2-one and 5-chloroindolin-2-one derivatives, *Turk J. Pharm. Sci.* **9** (2012) 353-358.
28. G. More, D. Raut, K. Aruna, S. Bootwala, Synthesis, spectroscopic characterization and antimicrobial activity evaluation of new tridentate Schiff bases and their Co (II) complexes, *J. Saudi Chem. Soc.* **21** (2017) 954-964.
29. Faridoon, W.M. Hussein, P. Vella, N.U. Islam, D.L. Ollis, G. Schenk, R.P. McGeary, 3-Mercapto-1,2,4-triazoles and N-acylated thiosemicarbazides as metallo-beta-lactamase inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **22** (2012) 380-386.
30. M.S. Mohamed, W.M. Hussein, R.P. McGeary, P. Vella, G. Schenk, R.H. Abd Elhameed, Synthesis and kinetic testing of new inhibitors for a metallo-beta-lactamase from *Klebsiella pneumonia* and *Pseudomonas aeruginosa*, *Eur. J. Med. Chem.* **46** (2011) 6075-6082.
31. Faridoon, N.U. Islam, An update on the status of potent inhibitors of metallo-beta-lactamases, *Sci. Pharm.* **81** (2013) 309-327.
32. A. Makena, A.O. Düzgün, J. Brem, M.A. McDonough, A.M. Rydzik, M.I. Abboud, A. Saral, A.Ç. Çiçek, C. Sandalli, C.J. Schofield, Comparison of Verona integronborne metallo-beta-lactamase (VIM) variants reveals differences in stability and inhibition profiles, *Antimicrob Agents Chemother.* **60** (2015) 1377-1384.
33. T-C.Chou, P.Talalay, Quantitative analysis of dose-effect relationship : the combined effects of multiple drugs of enzyme inhibitors, **22** (1984) 27-55.
34. N.G. Stephanopoulos, A.A. Aristidou, J. Nielsen, CHAPTER5-Regulation of Metabolic Pathways, *Metabolic Engineering*, **12** (1998) 147-202.
35. J. Yusnita, S. Puvaneswary, H.M. Ali, W.T. Robinson, K-L.Thong, Synthesis, structural characterization and antibacterial activity of 2,6-diacetylpyridin bis(benzenesulfonylhydrazide) Schiff bases and their copper(II) complexes, *Polyhedron.* **28** (2009) 3050-3054.

Conclusion générale

Conclusion Générale

Conclusion générale

Dans ce travail nous avons synthétiser et caractériser quatre ligands bases de Schiff (H_2L^2 , H_2L^3 , H_2L^4 et H_2L^5) et leurs complexes avec le zinc ($Zn(II)L^2$, $Zn(II)L^3$, $Zn(II)L^4$ et $Zn(II)L^5$). Les quatre ligands se sont révélés possesseurs d'une bonne activité inhibitrice vis-à-vis des MBLs car ils exercent cette inhibition à des concentrations de dizaines de micromolaires. Le ligand H_2L^2 ($IC_{50} = 33.35 \pm 1,00 \mu M$) est plus actif que les trois autres ligands ($IC_{50} > 33.35 \mu M$). Les structures moléculaires ont été optimisés par la DFT en utilisant la méthode 6-31G (d, p). Après optimisation, la charge atomique Mulliken, le potentiel électrostatique moléculaire (MEP), les propriétés des orbitales moléculaires de frontière (HOMO, LUMO), les propriétés optiques non-linéaires (NLO) et les propriétés thermodynamiques de H_2L^2 , H_2L^3 , H_2L^4 et H_2L^5 ont été déterminés. Les résultats obtenus indiquent que le ligand H_2L^2 , avec un plus petit écart d'énergie (HOMO, LUMO), est plus souple, moins stable, plus électrophile et plus réactif que le reste des ligands. A partir des calculs théoriques effectués pour ces ligands, on peut conclure que leurs propriétés électroniques corréllent bien avec leurs activités inhibitrices des MBLs quantifiées par le paramètre de l' IC_{50} c'est à dire plus la réactivité du ligand augmente plus ce paramètre diminue.

Les quatre ligands et leurs quatre complexes ont été également testés en ce qui concerne leur activité antibactérienne. Ils se sont révélés actifs sur les especes bacteriennes Gram+ mais inactifs sur les especes bacteriennes Gram-. L'opposition de la paroi cellulaire de ces dernieres à la pénétration de ces molécules semble être à l'origine de cette inactivité.

Perspectives

A la lumière de cette conclusion, nous envisageons :

- La reproduction des mêmes tests avec des MBL purifiés.
- L'élargissement de la gamme des ligands chélatants testés.
- Recherche d'effet potentialisateur des antibiotiques sur la croissance de bactérie résistante (effet sur zone d'inhibition et/ou sur CMI).

ANNEXES

SPECTROSCOPIE I.R

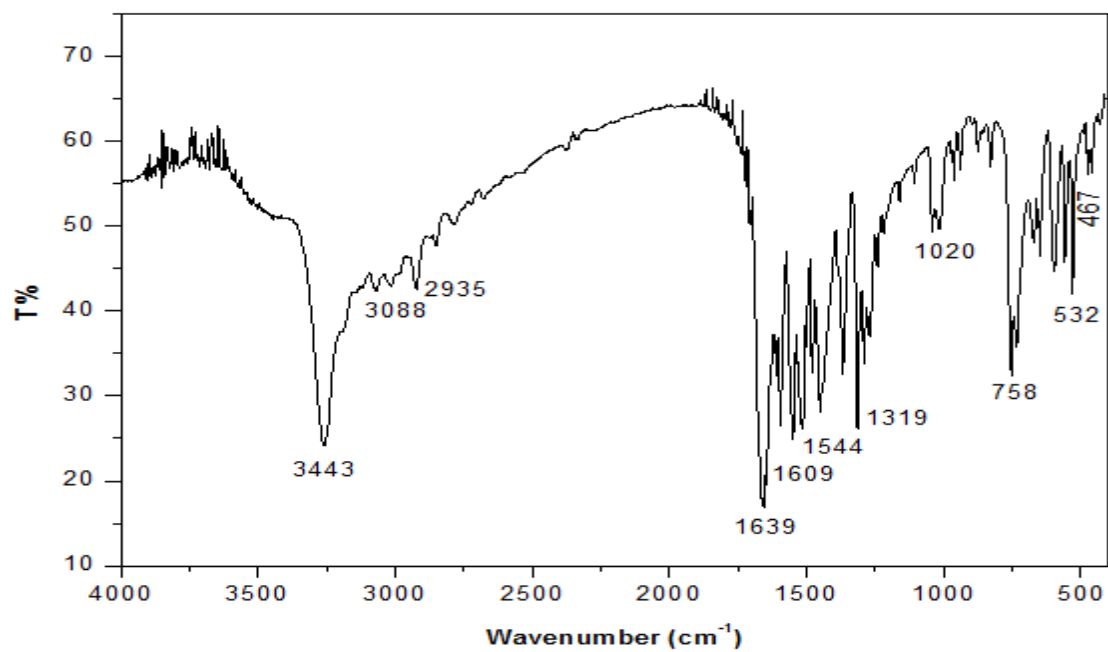


Figure 1. Spectre IR du ligand H₂L¹.

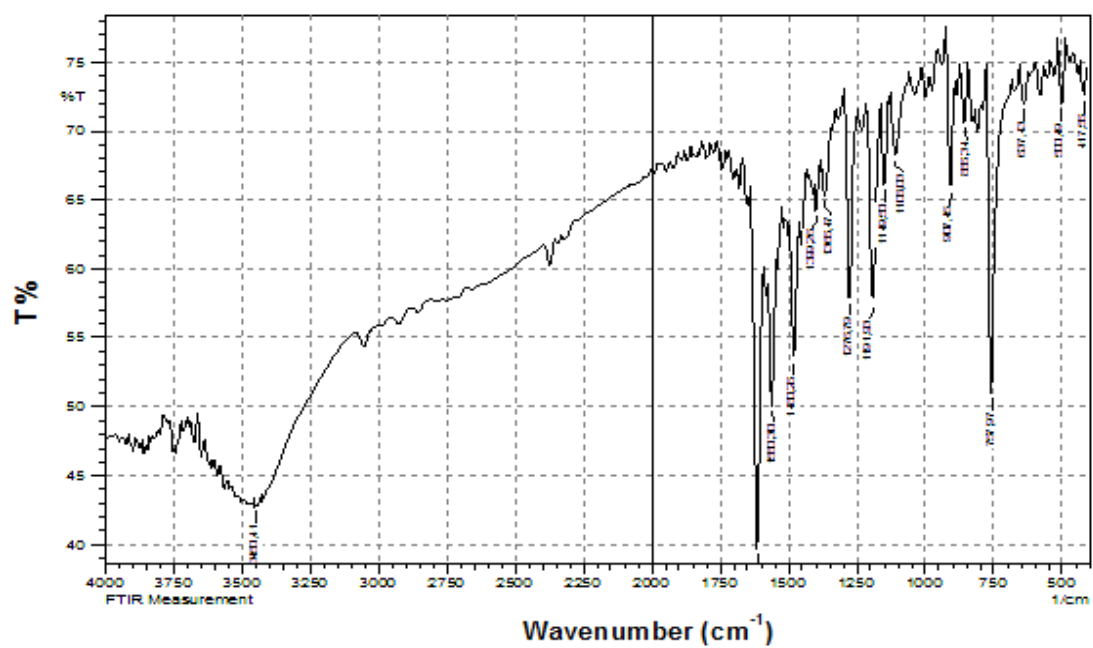


Figure 2. Spectre IR du ligand H₂L².

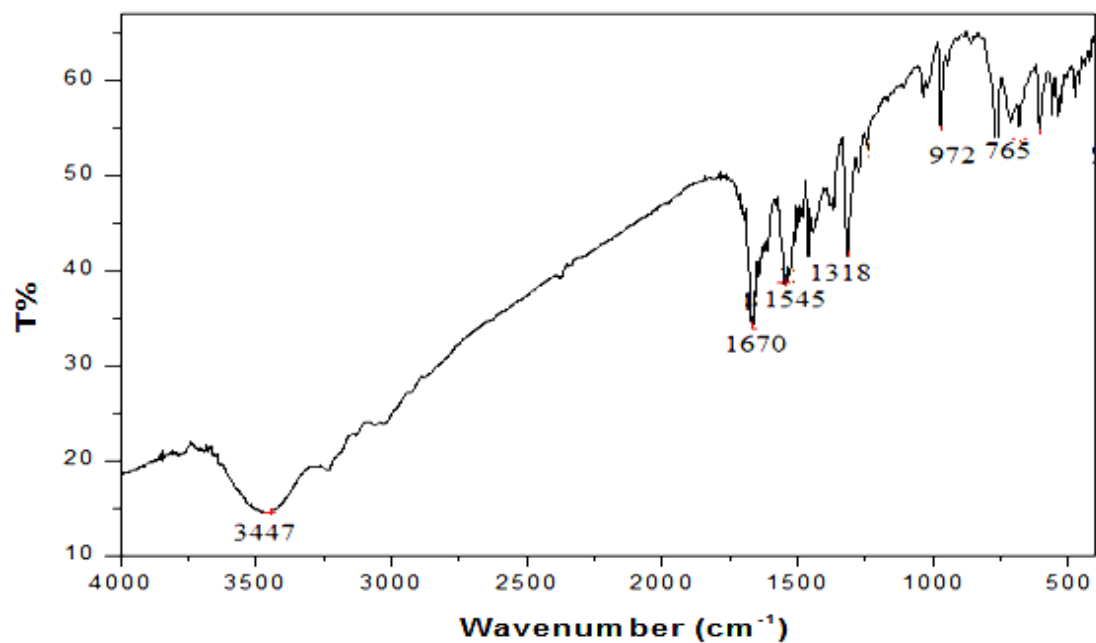


Figure 3. Spectre IR du ligand H₂L³.

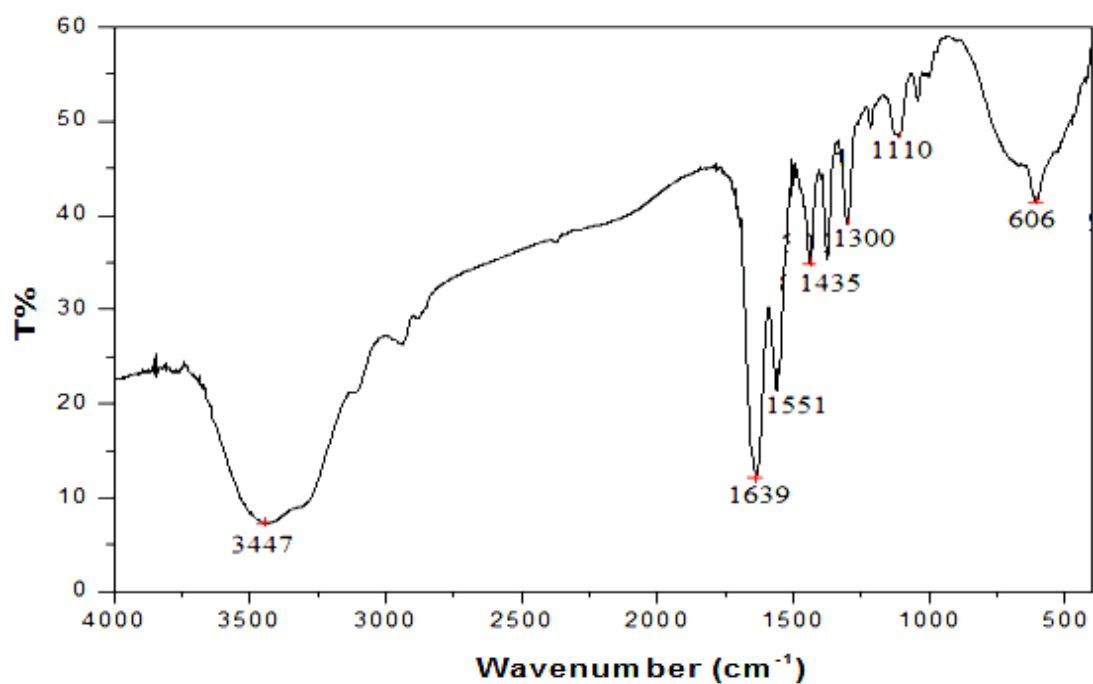


Figure 4. Spectre IR du ligand H₂L⁴.

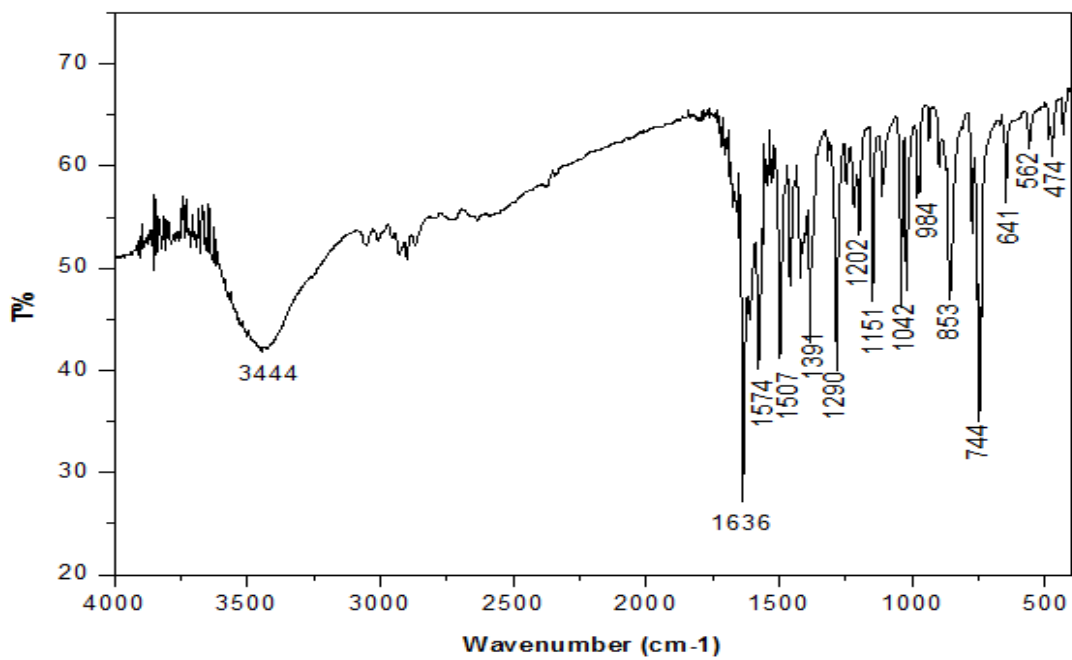


Figure 5. Spectre IR du ligand H_2L^5 .

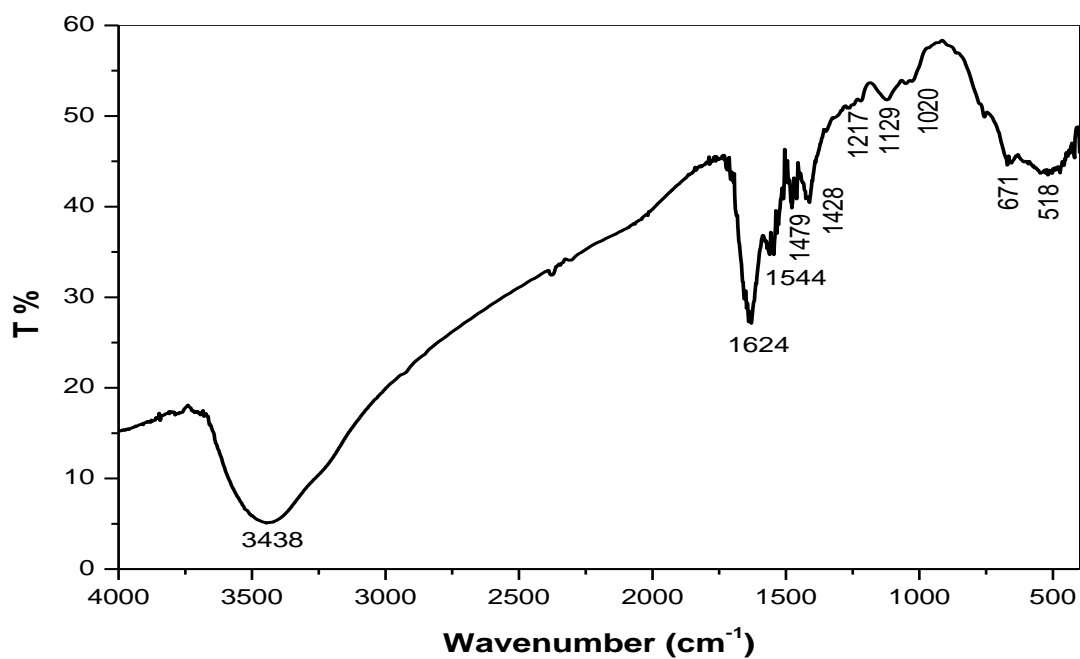


Figure 6. Spectre IR du complexe $Zn(II)L^1$.

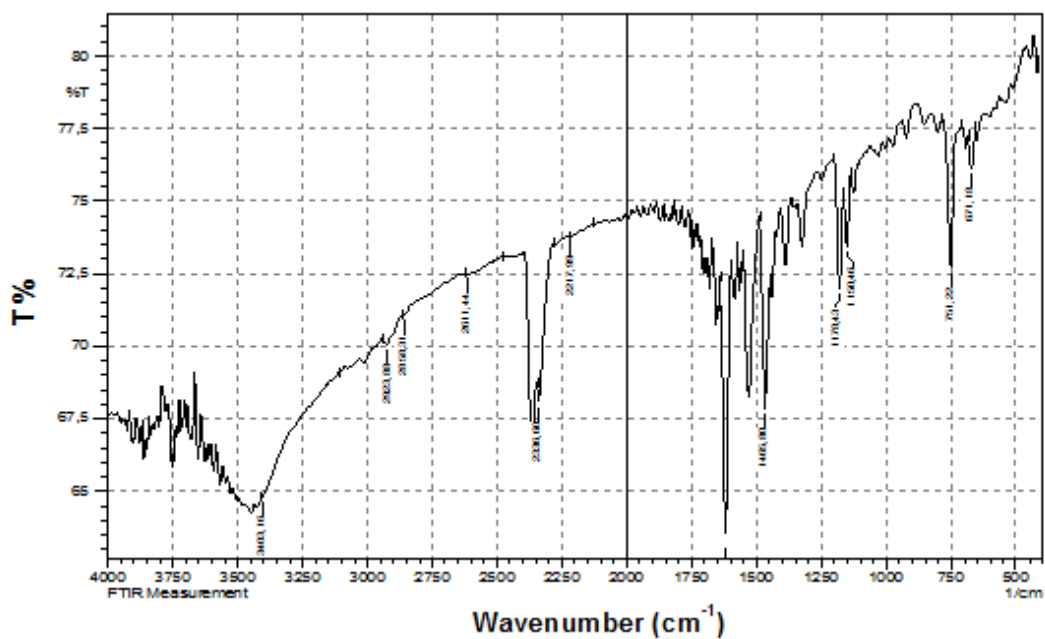


Figure 7. Spectre IR du complexe Zn(II)L².

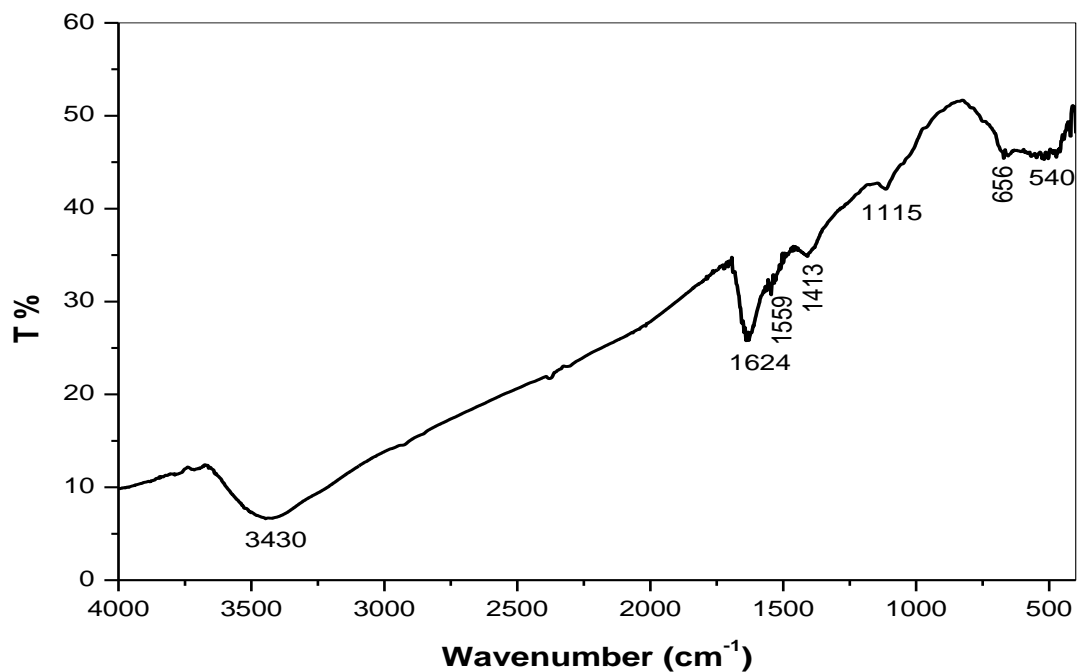


Figure 8. Spectre IR du complexe Zn(II)L³.

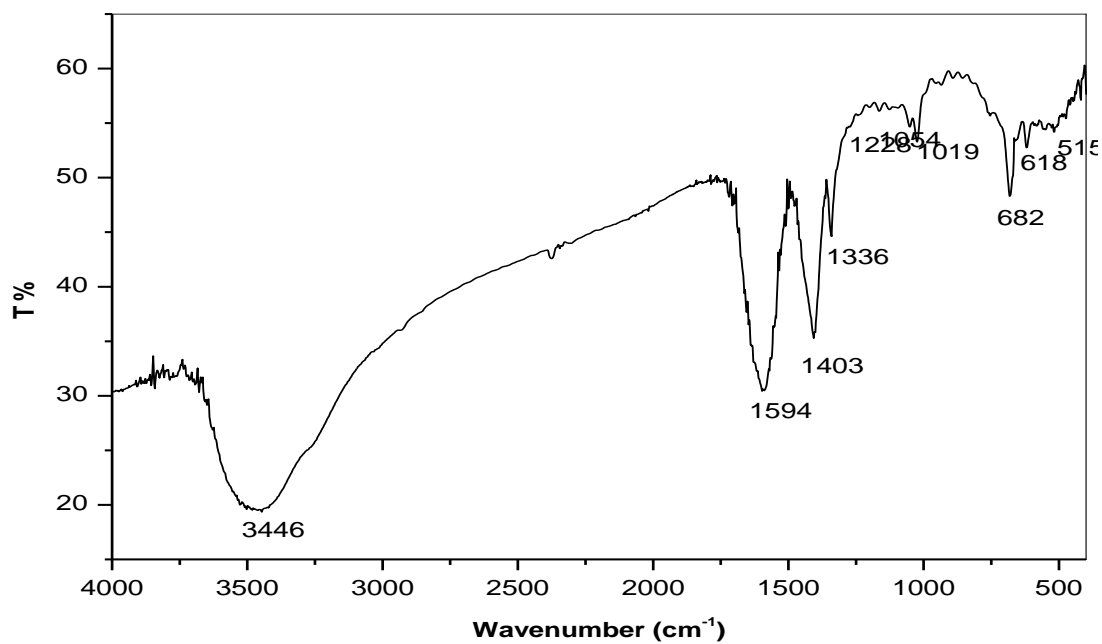


Figure 9. Spectre IR du complexe Zn(II)L⁴.

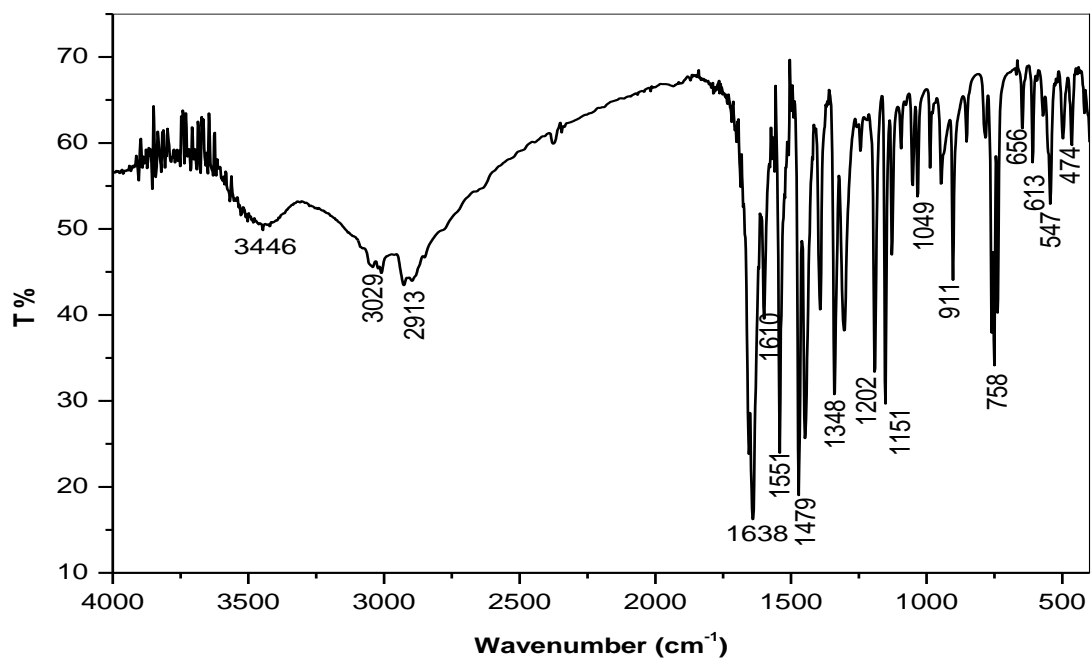


Figure 10. Spectre IR du complexe Zn(II)L⁵.

SPECTROSCOPIE ELECTRONIQUE

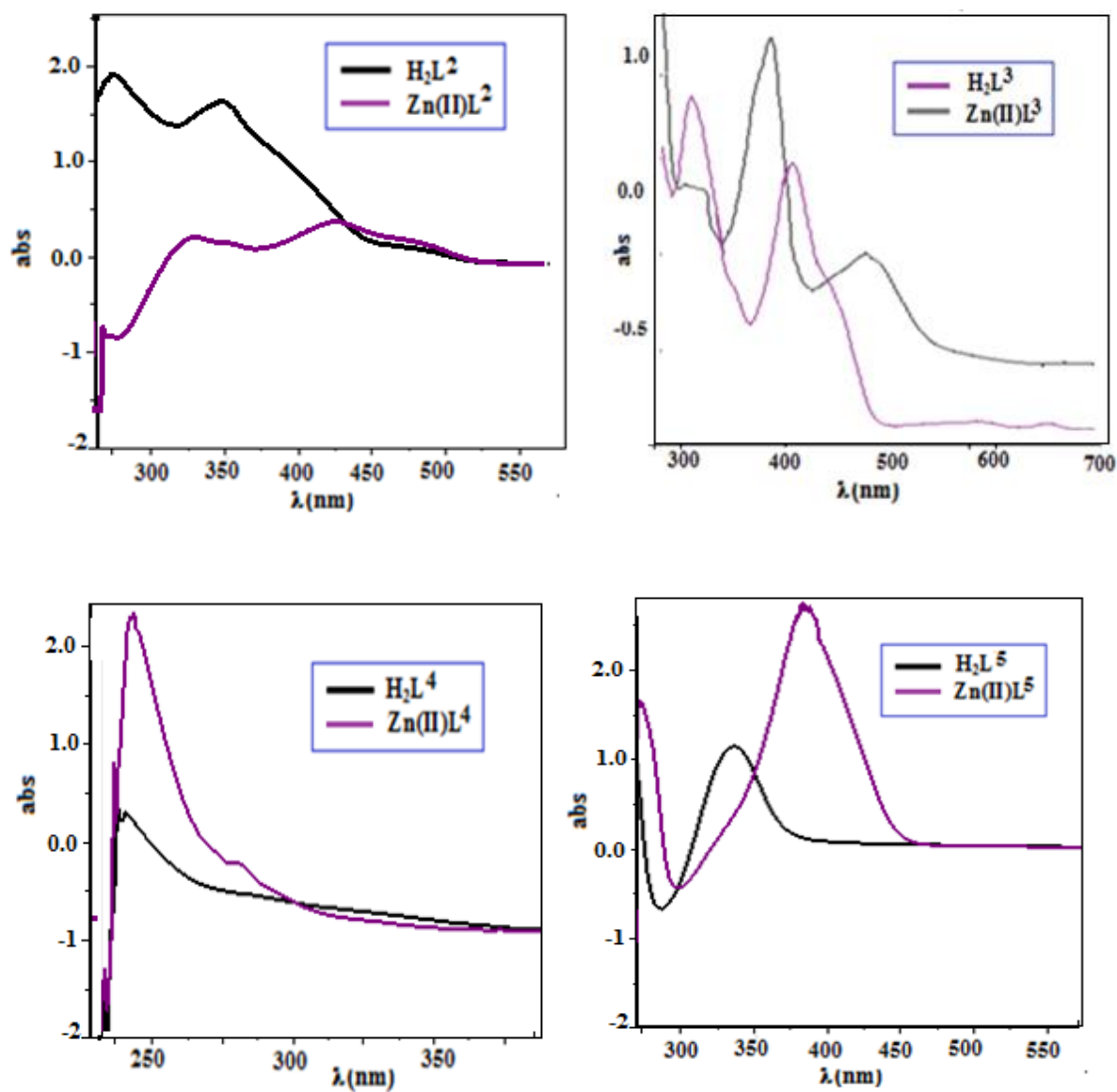


Figure 11. Spectres UV-Vis des ligands H_2L^1 , H_2L^2 et H_2L^4 et leurs complexes $Zn(II)L^1$, $Zn(II)L^2$ et $Zn(II)L^4$ dans le DMF.

RMN ¹H

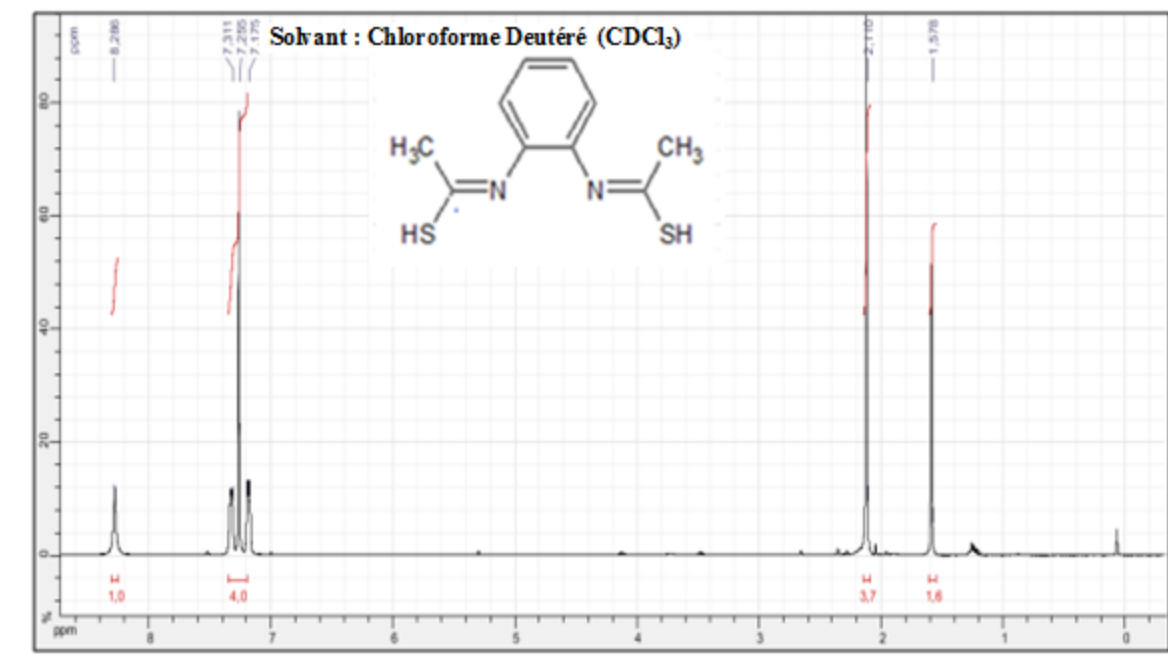


Figure 12. Spectre RMN ¹H du composé H₂L³.

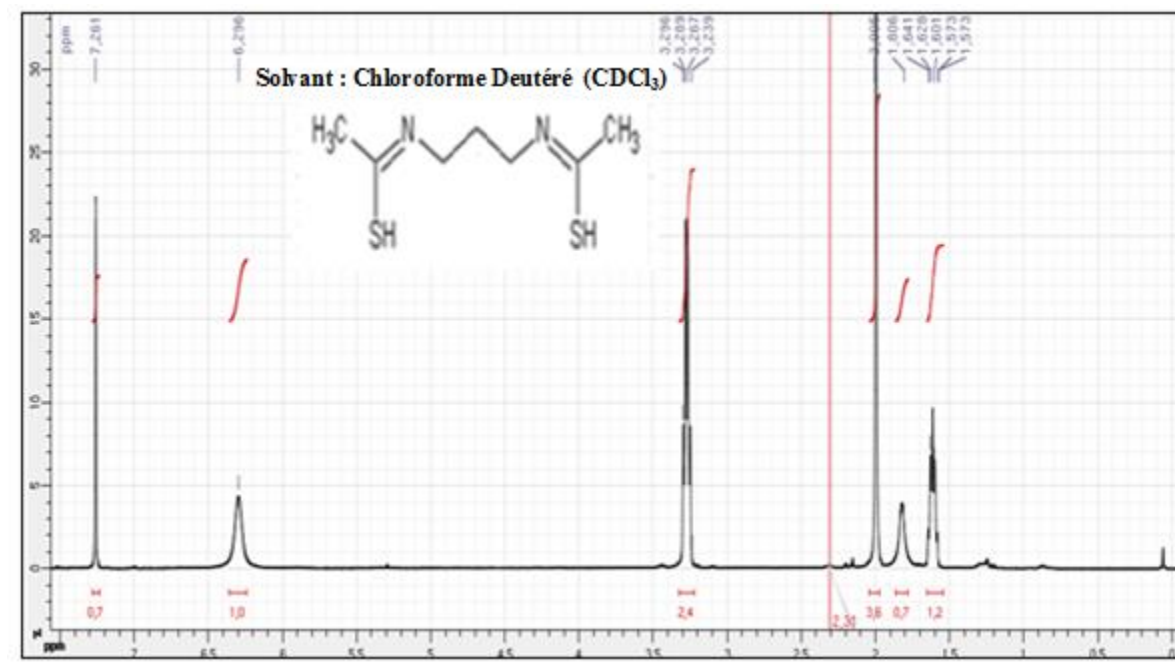


Figure 13. Spectre RMN ¹H du composé H₂L⁴.

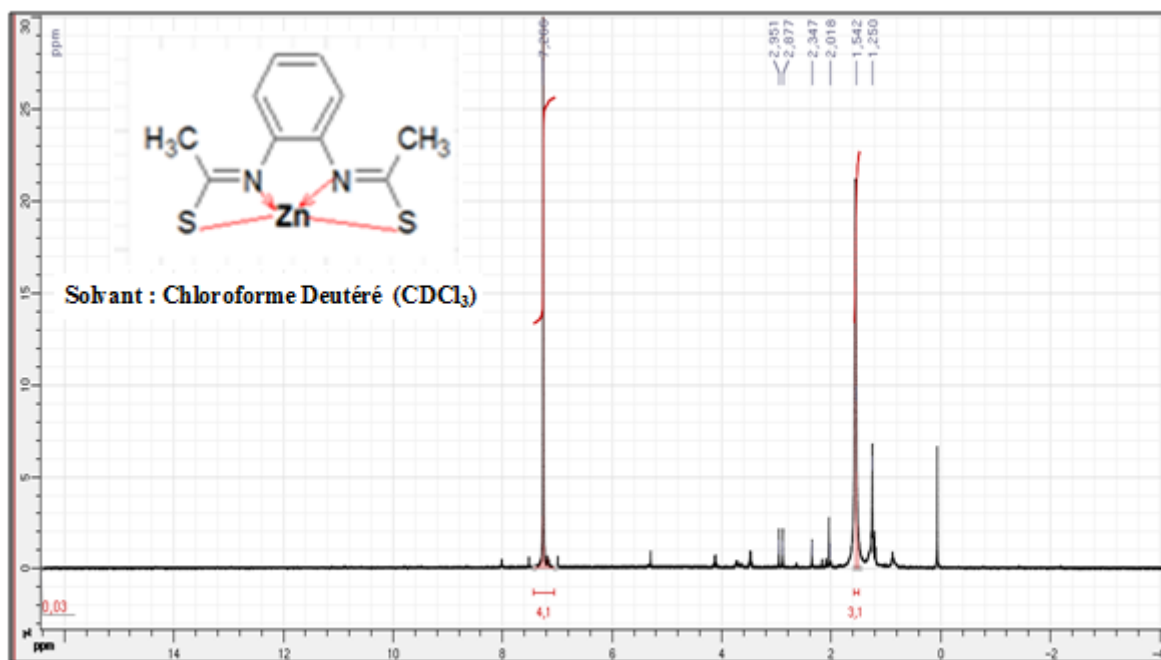


Figure 14. Spectre RMN ¹H du composé Zn(II)L³.

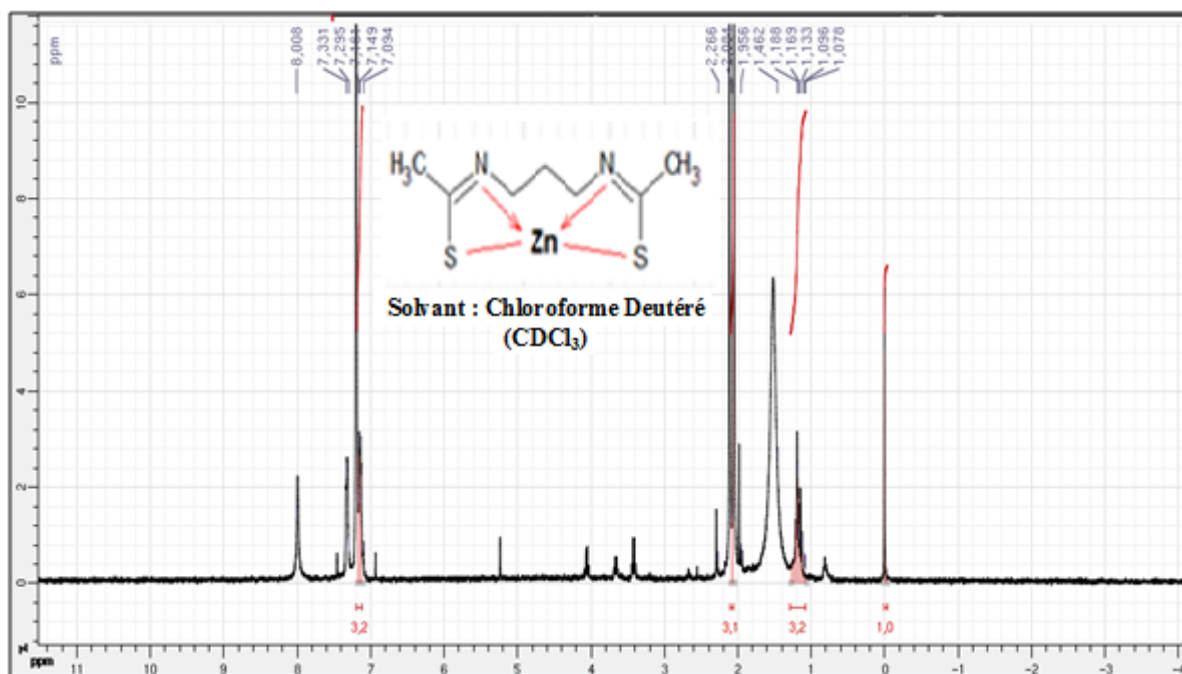


Figure 15. Spectre RMN ¹H du composé Zn(II)L⁴.

RMN ^{13}C

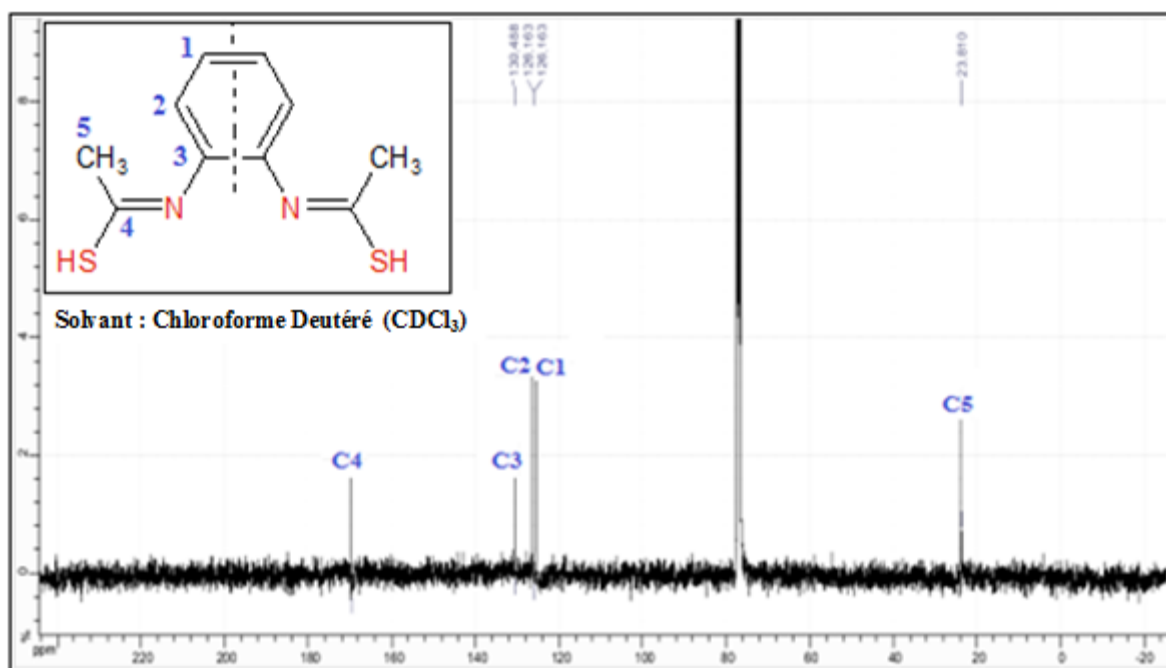


Figure 16. Spectre RMN ^{13}C du H_2L^3 .

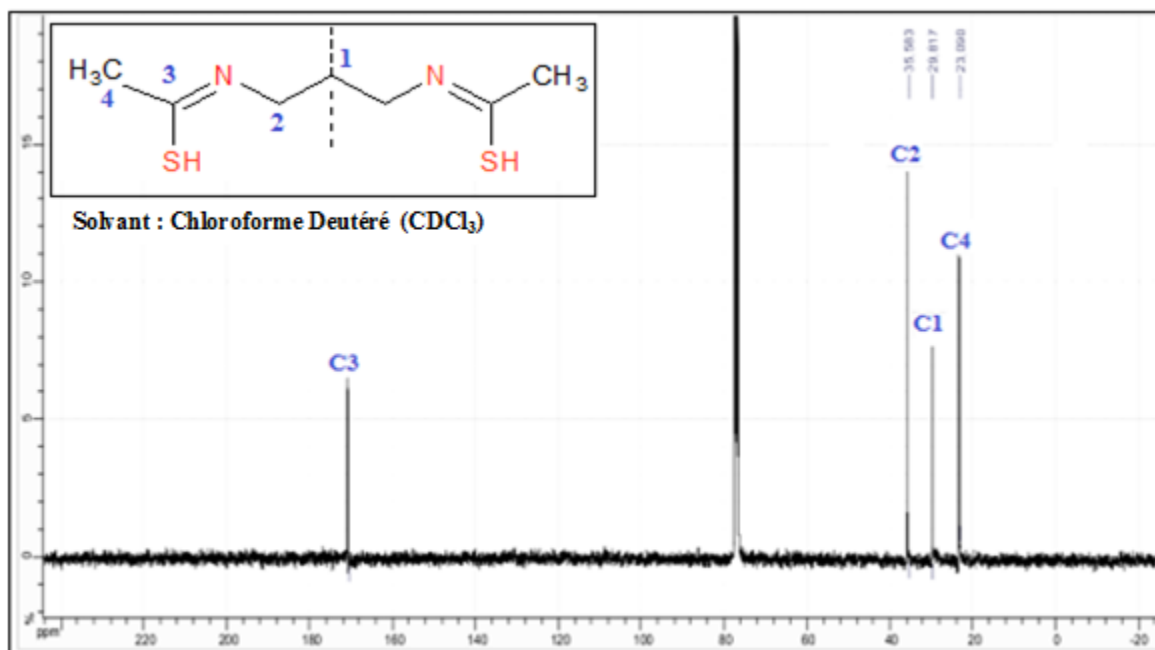
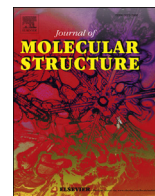


Figure 17. Spectre RMN ^{13}C du H_2L^4 .



Synthesis, spectral characterization, DFT computational studies and inhibitory activity of novel N₂S₂ tetradentates Schiff bases on metallo-beta-lactamases of *Acinetobacter baumannii*

Zakia Messasma^{a, b}, Ali Ourari^{a, **}, Rachid Mahdadi^b, Selma Houchi^b,
Djoughra Aggoun^{a, *}, Abdallah Kherbache^b, Embarek Bentouhami^c

^a Laboratoire d'Électrochimie, d'Ingénierie Moléculaire et de Catalyse Rédox (LEIMCR), Département de Génie des Procédés, Faculté des Sciences de l'Ingénieur, Université Ferhat ABBAS, Sétif-1, Sétif, 19000, Route de Bejaia Maabouda, Algeria

^b Laboratoire de Biochimie Appliquée, Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Ferhat ABBAS, Sétif-1, Sétif, 19000, Route de Bejaia Maabouda, Algeria

^c Laboratoire de Chimie, Ingénierie Moléculaire et Nanostructures (LCIMN), Département de Génie des Procédés, Faculté de Technologie, Université Ferhat ABBAS, Sétif-1, Sétif, 19000, Route de Bejaia Maabouda, Algeria

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 May 2018

Received in revised form

11 June 2018

Accepted 11 June 2018

Keywords:

Schiff base ligands

Spectral characterization

DFT-Calculations

Metallo-beta-lactamases

Enzymatic inhibition

ABSTRACT

Tetradentates N₂S₂ Schiff base ligands **H₂L¹** and **H₂L²** were synthesized respectively from orthophenylenediamine and 1,3-diaminopropane which were condensed on thioacetic acid in ethanolic solutions. These synthesized chelating agents were structurally characterized by the routine physicochemical methods such as FT-IR, ¹H and ¹³C NMR, molar conductance and UV–Vis spectrophotometry. The both Schiff bases **H₂L¹** and **H₂L²** were used as inhibitors agents towards the metallo-beta-lactamases enzymes (MBLs). These enzymes were extracted from *Acinetobacter baumannii*. It revealed that they have a significant inhibitory effect basing on their IC₅₀ values, compared to the standard inhibitor like EDTA. Accordingly, these ligands were found to be efficient inhibitors towards MBLs activity. Molecular structures of the obtained compounds with their electronic properties were also investigated using density functional theory (DFT) via B3LYP/6-31G (d,p) method. The essential results obtained from this method have been found to be in good correlation with the decreasing of the energetic gap values (HOMO, LUMO) seeing that as these gap values of **H₂L¹** and **H₂L²** decrease, their IC₅₀ decrease. As a consequence, the resulting inhibitory effects become consequently increased.

© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

During the last decades, the beta-lactam antibiotics are widely applied for treating some diseases currently caused by bacterial infections. In this case, it is commonly known that these bacteria develop resistance towards drugs, used as antibiotics developing several mechanisms [1–3] such as beta-lactamases production.

Acinetobacter baumannii is one of the most common nosocomial pathogen among all the *Acinetobacter* species [4] able to induce some diseases presenting serious difficulties for their treatment. As example, carbapenems are considered as the drug of choice for the

treatment of diseases, essentially caused by the pathogenic species above mentioned. This latter begins to develop their resistance mechanism against carbapenems predominantly producing MBLs-enzymes which mainly require zinc ions to catalyze the hydrolysis beta-lactam ring. This kind of MBLs-enzymes, hypothetically, possess effectively the property of being easily inhibited by a large variety of chelating agents like Schiff base ligands easily coordinating the divalent ions of transition metal.

Therefore, the use of these compounds as the main precursors to ensure their chelation by this class of ligands seems to be, to our knowledge, not reported in the literature. For this reason, it is commonly known that the use of molecular ligands like porphyrinic, cyclams and Schiff base ligands have been proved that they play a very important role in several applications such as catalysis [5], electrocatalysis [6], sensors with diverse biological activities like antifungal [7], antibacterial [8], antimalarial [9], anti

* Corresponding author.

** Corresponding author.

E-mail addresses: alourari@yahoo.fr (A. Ourari), aggoun81@yahoo.fr, agghafida@gmail.com (D. Aggoun).

inflammatory [10] and enzymatic inhibition [11]. The transition metal complexes obtained from the Schiff base ligands appeared as stable compounds seeing that the metal atom is essentially coordinated to the nitrogen (azomethine) and oxygen (phenoxy) which are currently used as donor atoms in coordination chemistry.

This work aims to synthesize some new Schiff base ligands $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^1$ and $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^2$ to use them as enzyme inhibitors of Zn-MBLs which are usually extracted from *Acinetobacter baumannii*. This approach focuses the preparation of new efficient drugs which could be combined with antibiotics for treatment a wide spectrum of bacterial infections.

So, we describe here the synthesis of new tetradentates Schiff bases ligands obtained in situ by mixing thioacetic acid with orthophenylenediamine and 1,3-diaminopropane in 2:1 M ratios, respectively. The synthesized compounds have been characterized by routine NMR, FT-IR and UV-Vis absorption spectroscopy. The molecular structures of these Schiff bases were also confirmed by DFT calculations method. The inhibitory activity of the both compounds was also reported. The relevant equation for the formation of the both ligands $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^1$ and $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^2$ is presented in the following Scheme 1.

2. Experimental

2.1. Reagents and equipments

All the chemicals and solvents used were of an analytical grade and were used as received without any further purification. Purity of the synthesized compounds was checked by means of thin-layer chromatography (TLC) by using an eluent ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$) (9.5/0.5, v/v); glass plates precoated with silica gel (60F, Merck), were used. Melting points were measured with a Kofler bench 7779 apparatus. FT-IR spectra of synthesized compounds were recorded in KBr discs, with a PerkinElmer 1000 FT-IR Spectrophotometer in transmittance mode, whereas the UV-visible spectra were obtained using a Unicam UV-300 spectrophotometer in the range 200–800 nm, using dimethylformamide (DMF) solutions (A cell length of 1 cm). Conductivity measurements were obtained from

solutions of DMF using a Conductivity Meter Lab CDM-210 at 25 °C, the concentration of each solution was of $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. As for the ^1H and ^{13}C NMR spectra were performed with the aid of a Bruker Avance 400-MHz spectrometer using CDCl_3 as solvent and tetramethylsilane (TMS) as internal reference. All chemical shifts ^1H and ^{13}C are given in ppm.

2.2. Synthesis of Schiff bases ligands

N,N' -(1,2-phenylene)diethanimidothioic acid ($\mathbf{H}_2\mathbf{L}^1$)

0.152 mg (2 mmol) of thioacetic acid were dissolved in ethanol (10 mL) and stirred at room temperature. Then, this solution was added drop-wise to 10 mL of an ethanolic solution containing 108 mg (1 mmol) of 1,2-diaminobenzene. This mixture is heated at 50 °C and held under stirring until it turns into brown color indicating that the Schiff base is formed. The obtained precipitate was filtered off, washed with small portions of cold ethanol and then with diethylether. The resulting solid was dried under vacuum containing CaCl_2 . The expected compound $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^1$ was obtained with a yield of 42%.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , δ ppm): 8.25 (s, 1H, SH), 7.53–7.10 (m, 4H, Ar-H), 2.11 (s, 3H, CH_3). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , δ ppm): 125.20 (\mathbf{C}_1 , $\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}$), 126.16 (\mathbf{C}_2 , $\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}$), 130.25 (\mathbf{C}_3 , $\text{CH}=\text{CH}-\text{N}$), 169.41 (\mathbf{C}_4 , $\text{N}=\text{C}-$), 23.81 (\mathbf{C}_5 , $\text{N}=\text{C}-\text{CH}_3$). **FT-IR** (KBr, cm^{-1}): ν ($\text{C}-\text{S}$): 1318 cm^{-1} , ν ($\text{C}=\text{N}$): 1670 cm^{-1} , ν ($\text{C}=\text{C}$): 1545 cm^{-1} and ν ($\text{S}-\text{H}$): 3447 cm^{-1} . **UV-Vis** (DMF) λ_{max} (nm): $\lambda_{\text{max}}(1)$ (280), $\lambda_{\text{max}}(2)$ (398).

N,N' -(1,3-propylidene)diethanimidothioic acid ($\mathbf{H}_2\mathbf{L}^2$)

The experimental procedure applied for the synthesis of $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^2$ was similarly reproduced as described in the literature for $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^1$ [12]. 0.152 mg (2 mmol) of thioacetic acid were dissolved in ethanol (10 mL) and stirred at room temperature. Then, this solution was added drop-wise to 10 mL of an ethanolic solution containing 88 mg (1 mmol) of 1,3-diaminopropane. The Schiff base ligand $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^2$ was recovered with a yield of 38%.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , δ ppm): 6.3 (s, 1H, SH), 3.26 (m, 4H, $\text{CH}_2-\text{N}=\text{C}$), 2.00 (s, 3H, CH_3), 1.5 (m, 5H, $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}$). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , δ ppm): 170.61 (\mathbf{C}_3 , $\text{C}=\text{N}$), 35.82 (\mathbf{C}_2 , $\text{CH}_2-\text{N}=\text{C}$), 30.06 (\mathbf{C}_1 , $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}$), 23.33 (\mathbf{C}_4 , $\text{C}-\text{CH}_3$). **FT-IR** (KBr, cm^{-1}): ν ($\text{C}-\text{S}$): 1300 cm^{-1} , ν ($\text{C}=\text{N}$): 1639 cm^{-1} and ν ($\text{S}-\text{H}$): 3447 cm^{-1} . **UV-Vis** (DMF) λ_{max} (nm): 250.

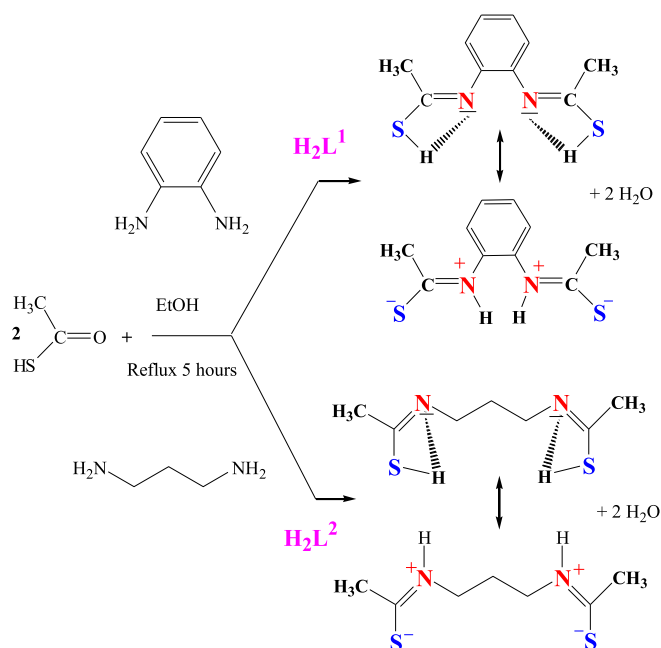
2.3. Computational studies

Density functional theory (DFT) and time-dependant DFT calculations were conducted with a hybrid functional B3LYP (Becke's three parameter using the Lee–Yang–Parr correlation function) were performed employing the Berny method [13,14] at 6-31G (d,p) basis set, were used for optimizing the Schiff bases $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^1$ and $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^2$. This process was carried out with the Gaussian 09 software package [15] and Gauss view visualization 5.0.8 program [16]. No imaginary frequencies were obtained during vibrational frequency calculations, indicating that all structures were stable. After optimization, Mulliken atomic charge, molecular electrostatic potential (MEP), properties of frontier molecular orbitals (HOMO, LUMO), non-linear optical properties (NLO) and thermodynamic properties of $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^1$ and $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^2$ were analyzed using results calculated at the B3LYP/6-31G (d,p) method.

2.4. Inhibition of metallo-beta-lactamases

2.4.1. Bacterial strain

The *A. baumannii* strain used in this study was isolated from a hospitalized patient at Sétif University Hospital in 2013 (Algeria). It was identified with a series of 20 ready biochemical compounds (API-20 E gallery, Biomériaux -France-).



Scheme 1. Synthesis protocol of the tetradentates Schiff bases ligands $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^1$ and $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^2$.

2.4.2. Extraction of β -lactamases

A. baumannii strain was grown in 1.5 L of brain heart infusion (BHI) at 37 °C with 250 μ g of imipenem under vigorous agitation for 24 h. The cells were concentrated by centrifugation at 18000 \times g for 30 min. Crude enzymatic preparations were made by sonicating (vibracell-USA) for 12 s (two cycles) with 12 s cooling in between sonications, this was repeated seven times. The lysates were centrifuged at 4 °C, 20 000 \times g for 30 min. Nucleic acids were precipitated by the addition of 2% streptomycin sulfate and centrifuged at 18000 \times g for 30 min. The supernatant was dialyzed overnight, concentrated with polyethylene glycol (PEG) against phosphate buffer (pH 7, 0.5 M), and used for further analysis [17].

2.4.3. Confirmatory tests

In this study, the imipenem-EDTA combined disc test (CDT), inhibition by ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), clavulanic acid and beta-lactamases profil-substrats, were used as a confirmatory tests for metallo-beta-lactamases production [17].

2.4.4. Kinetic parameters of metallo-beta-lactamases

All kinetic measurements were performed at 30 °C in 50 mM HEPES buffer (pH 7.2) supplemented with 50 μ M ZnSO₄, 0.005 mg/ml BSA and 10 μ L semi-purified extract of metallo-beta-lactamases. The wavelengths and changes in extinction coefficients used in the spectrophotometric assays were $\epsilon_{235 \text{ nm}} = 560 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ with penicillin. For cephaloridin, imipenem and aztreonam, parameters were as $\epsilon_{260 \text{ nm}} = 1000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; $\epsilon_{299 \text{ nm}} = 9000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ and $\epsilon_{320 \text{ nm}} = 700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, respectively. The variations in absorbance were measured using a UV-Vis-1800 (shimadzu, JAPAN) spectrophotometer by observing changes in absorption resulting from the opening of the β -lactam ring at specific wavelengths for each antibiotic evaluated. The values of kinetic parameters (K_m and V_{max}) were determined by measuring the initial rate using SIGMAPLOT 12.0. The results are presented as the average \pm standard deviation based on four independent measurements. The protein concentration of semi-purified extract was determined using the Bradford assay [18]; the Coomassie Plus protein assay reagent and bovine serum albumin as a standard [17].

2.4.5. Metallo-beta-lactamases inhibitory activity assay

The purpose of this assay is to identify compounds that act as inhibitors of *Acinetobacter baumannii* MBLs. To examine this effect, an enzyme assay was performed by determining the C_{50} which is defined as the concentration of inhibitor necessary to inhibit 50% MBLs activity. The assay was performed at 30 °C in 0.65 mL of assay buffer (50 mM HEPES; pH 7.2; 50 μ M ZnSO₄; 150 mM NaCl and 0.005 mg BSA/mL) after incubating of 10 μ L semi-purified extract of metallo-beta-lactamases for 10 min with varied final concentrations of EDTA (1 μ M–5 mM), clavulanic acid (1 μ M–7 mM), and Schiff bases **H₂L¹** (1–80 μ M) and **H₂L²** (1–100 μ M) and initiating the reaction with cephaloridin (80 μ M). Percentage of Inhibition of beta-lactamase was calculated as follows:

$$\text{Inhibition \%} = 100 \times [1 - (\text{Ac}/\text{Ae})] \quad (1)$$

where, **Ac**: metallo-beta-lactamase activity without inhibitors and **Ae**: metallo-beta-lactamase activity with inhibitor.

2.4.6. Statistical analysis

All the assays were carried out in triplicate and the results are expressed as mean values and standard deviation (SD). The results were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett post-test using Graphpad Prism (version 3.02 for windows; GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Values were considered significantly different if $P < 0.05$ and highly significantly

different if $P < 0.01$ and $P < 0.001$.

3. Results and discussion

3.1. Physical properties

The observed physical properties of Schiff base ligands **H₂L¹** and **H₂L²** are collected in Table 1. The both ligands are colored, air stable at room temperature in their solid state and are above decomposed on the Kofler bench at 260 °C and 280 °C, respectively. They are also soluble in common organic solvents such as DC, MeOH, EtOH, DMF and DMSO. The results of molar conductivity measurements suggest that all compounds are of non-electrolytic nature [19–21]. However, Livingstone and Oluka [22] reported similar molar conductance values for their compounds and explained that these behaviors by partial solvation of the compounds in the used solutions.

3.2. Spectroscopic characterization

The ligands **H₂L¹** and **H₂L²** present a symmetry according which only the half resonances are observed on the spectra of NMR. As a result, the ¹H NMR of the **H₂L¹** Schiff base presents three aromatic protons as multiplet (7.53–7.10) ppm (triplet and doublet) centered at 7.25 ppm. As for the methyl protons (2CH₃, 6H), they are quite low and they are ≤ 3 ppm [23]. These protons are observed as singlet at 2.11 ppm. Concerning the proton of the SH function, it resonates at 8.25 ppm. While the ¹H NMR of **H₂L²**, the methyl proton (2CH₃, 6H) are observed as singlet at 2 ppm and the proton of the SH function is observed at 6.3 ppm (See Figs. S1 and S2).

As for the ¹³C NMR of **H₂L¹**, the C₁, C₂ and C₃ (benzene carbons) signals are observed at 125.20, 126.16 and 130.25 ppm, respectively. The formation of Schiff base **H₂L¹** is supported by the presence of a peak corresponding to the azomethine carbon (C₄) located at 169.41 ppm. Additionally, the C₅ (methylene carbons) is observed at 23.61 ppm. Regarding the ¹³C NMR of **H₂L²**, the signals of methylene carbons are observed at 23.81, 30.06, 35.82 and 23.33 ppm corresponding to the C₁, C₂ and C₄, respectively. The peak located at 170.61 ppm corresponds to the azomethine carbon (C₃) (See Figs. S3 and S4) [24]. Therefore, a complete set of spectral data of these Schiff base ligands **H₂L¹** and **H₂L²** is given in Supplementary materials.

3.3. DFT computation

3.3.1. Vibrational spectroscopy

The harmonic vibrational frequencies for **H₂L¹** and **H₂L²** were calculated by DFT-calculations using 6-31G (d,p) method. The corresponding frequencies along with the assignments and intensities are given in Table 2, while the observed and calculated vibrational spectra are given in Fig. 1. In the FT-IR spectra, compounds **H₂L¹** and **H₂L²** exhibit a broad absorption band in the region from 3300 to 3800 cm⁻¹, respectively and centered at 3459 and 3422 cm⁻¹, that can be assigned to an intramolecular hydrogen bond arising from the presence of thiol groups in their molecular structures, while were calculated at 3464 and 3440 cm⁻¹, respectively. The strong band observed at 1667 cm⁻¹ for **H₂L¹** and at 1639 cm⁻¹ for **H₂L²** could be attributed to the C=N stretching vibration [25,26] which were in agreement with the calculated wavenumbers at 1649 and 1721 cm⁻¹, respectively. The experimental C–N bands in **H₂L¹** and **H₂L²** were observed as strong bands respectively at 1313 and 1300 cm⁻¹, which were computed at 1323 and 1297 cm⁻¹.

As presented in Table 2 and Fig. 1, it can be seen that the experimental values has a better correlation with the calculation values. This confirms the validities of the optimized structures of

Table 1
Physical data of Schiff bases $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^1$ and $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^2$.

Compound	Physical state	Molar mass (mol g ⁻¹)	Color	Yield (%)	R _f	M.p (C°)	Conductivity (ohm ⁻¹ .cm ² .mol ¹)
$\mathbf{H}_2\mathbf{L}^1$ (C ₁₀ H ₁₂ N ₂ S ₂)	Powder	224.22	Brown	42	0.59	260	3.79
$\mathbf{H}_2\mathbf{L}^2$ (C ₇ H ₁₄ N ₂ S ₂)	Powder	190.22	Pale- yellow	38	0.64	280	2.58

Table 2
The main vibrational frequencies and their assignment for the compound $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^1$ and $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^2$ calculated by B3LYP/6-31G (d,p) method.

$\mathbf{H}_2\mathbf{L}^1$			$\mathbf{H}_2\mathbf{L}^2$		
ν_{exp} (cm ⁻¹)	ν_{calc} (cm ⁻¹)	Assignment	ν_{exp} (cm ⁻¹)	ν_{calc} (cm ⁻¹)	Assignment
3459	3464	ν (SH)	3422	3440	ν (SH)
–	3055	ν_{asym} (CH) aromatic	–	3223	ν_{asym} (CH) aliphatic
3129	3130	ν_{sym} (CH) aromatic	3105	3099	ν_{sym} (CH) aliphatic
3026	3056	ν_{sym} (CH) aromatic	2981	2962	ν_{asym} (CH) aliphatic
1667	1649	ν (C=N)	2942	2953	ν_{sym} (CH ₃)
1462	1499	ν_{asym} (C=C) aromatic	1639	1721	ν (C=N)
1450	1454	δ_{sym} (CH ₃), δ_{sym} (CH ₂)	1442	1408	δ_{sym} (CH ₃), δ_{sym} (CH ₂)
1313	1323	ν (C–N)	1300	1297	ν (C–N)
1303	1263	ν (C–C)	1217	1212	ν (C–C)
1032	1030	In-plane CH deformation mode ω (CH ₂)	1126	1129	In-plane CH deformation mode ω (CH ₂)
864	866	out-of-plane CH deformation mode	898	858	out-of-plane CH deformation mode
695	701	δ_{sym} (CCC)	671	682	δ_{sym} (CCC)
614	609	δ (CNC)	617	653	δ (CNC)

ν , stretching; ν_{sym} , symmetric stretching; ν_{asym} , asymmetric stretching; δ , deformation; ω , wagging.

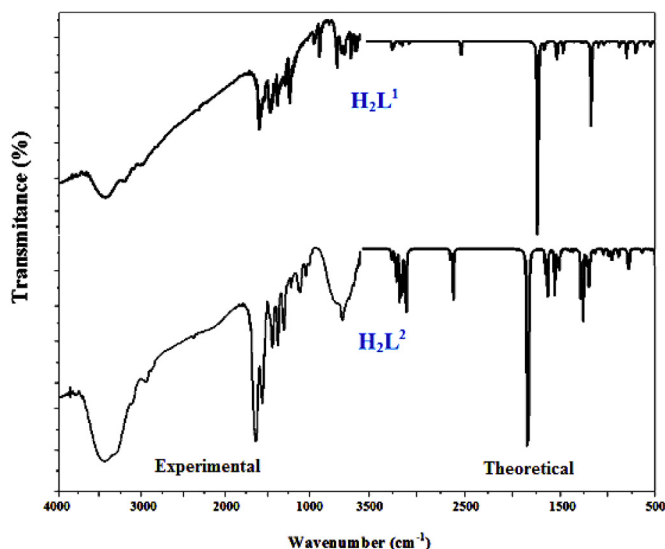


Fig. 1. Experimental and theoretical FT-IR spectra of $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^1$ and $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^2$.

the studied $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^1$ and $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^2$.

3.3.2. Electronic absorption spectra

TD-DFT calculations with the first 6 spin-allowed singlet–singlet excitations of the ligands in gas phase were performed by using B3LYP-6-31G (d,p) method to get more insight into the electronic spectra. Experimental and calculated spectra of the Schiff bases $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^1$ and $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^2$ are given in Fig. 2. The calculated excited states, absorption bands, oscillator strength (f_{os}), transition orbitals and their excitation energy are compiled in Table S4.

The assignment of the experimental bands to the calculated transitions is based on the criterion of the energy and oscillator strength of the calculated transitions. The absorption bands for $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^1$ and $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^2$ appeared at around 280, 398 and 250 nm, respectively. The energy absorption band at 280 nm is contributed by the

electron excitation from HOMO-1 to LUMO at 295 nm with oscillator strength of 0.0772, so this absorption can be ascribed to $\pi \rightarrow \pi^*$ electronic aromatic transition. The absorptions at 398 nm for $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^1$ and at 250 nm for $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^2$ are the contribution by electron excitation from HOMO-LUMO and HOMO-3 to LUMO. These orbitals have dominantly a π character, and thus, the absorption at 398 and 250 nm of $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^1$ and $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^2$, respectively, can be attributed to $n \rightarrow \pi^*$ transitions.

3.3.3. Molecular geometry

The optimized molecular structures with numbering scheme of the two ligands $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^1$ and $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^2$ are shown in Fig. 3. All the model molecules computed from the B3LYP/6-31G (d,p) method of calculation belonged to C1 point group. The selected structural parameters (bond length, bond angles and dihedral angles) of the title molecules calculated by DFT with B3LYP/6-31G (d,p) method are listed in Table S1. The C–C bonds attached to the substituted positions, orthophenylenediamine in $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^1$ with 1,3-diaminopropane in $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^2$, are considerably overestimated while the other C–C bonds have insignificant variations. The most important bonds of the Schiff bases $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^1$ and $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^2$ are C–N and C=N (azomethine). These bond lengths were obtained at 1.410, 1.475 Å and at 1.273, 1.270 Å for $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^1$ and $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^2$, respectively. The C–H bond distances, they lie respectively in the range from 1.081 to 1.091 Å, and from 1.092 to 1.100 Å for $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^1$ and $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^2$. The largest difference between $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^1$ and $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^2$ is 0.032 Å in the S–H bond length. The N–C–C angles of both ligands are all approximately same at 128.3° and also for N–C–S angles are all approximately same at 114.6°. All the dihedral angles in the both Schiff bases are close to either at –179 or +180°. The selected parameters (bond lengths, bond angles and dihedral angles) of $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^1$ and $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^2$ at all the levels of theory are presented in Tables S2,S3 (Supplementary materials).

3.3.4. Frontier molecular orbital (FMO) analysis

The HOMOs and LUMOs are known as Frontier molecular orbitals (FMOs), which played an important role for evaluating molecular chemical stability, chemical reactivity and hardness/softness of the molecule [27]. The HOMO and LUMO energy, energy

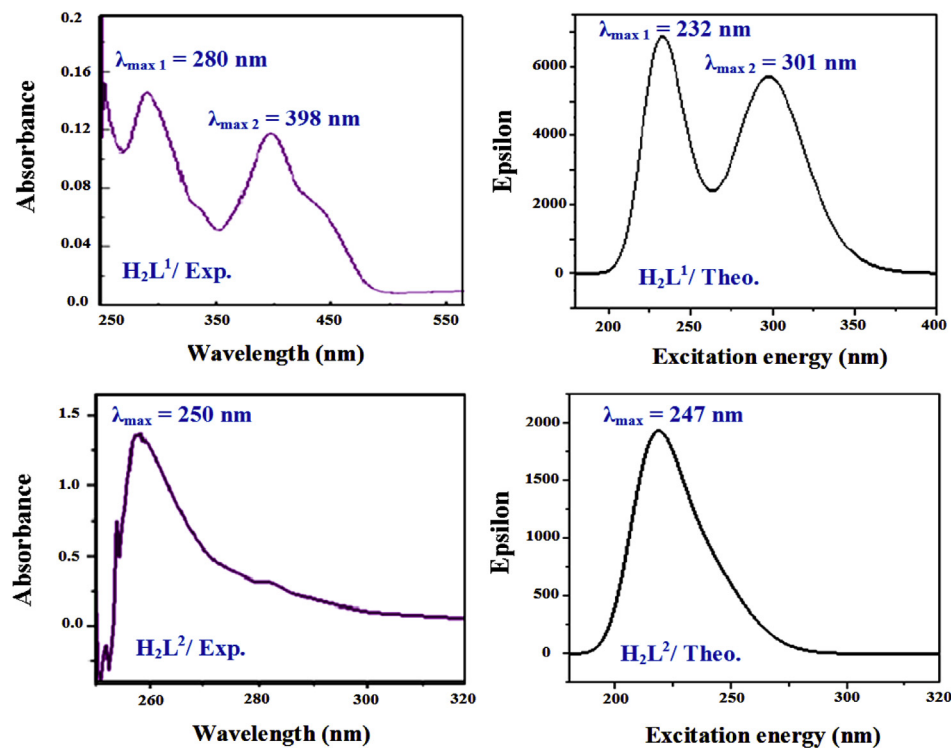


Fig. 2. Experimental and calculated electronic spectra of H_2L^1 and H_2L^2 .

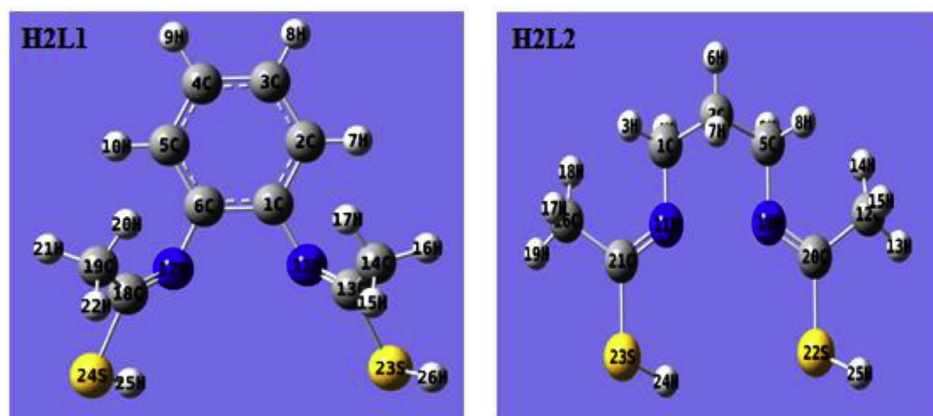


Fig. 3. Optimized structures of H_2L^1 and H_2L^2 with the numbering of atoms computed from the B3LYP/6-31G (d,p) method.

gap, ionization potential (I) [28], electron affinity (A) [28], electronegativity (χ) [29], electronic chemical potential (μ) [29], chemical hardness (η) [30], molecular Softness (S) [31] and electrophilicity index (ω) [31] are listed in Table 3. The HOMO acts as an electron donor, while the LUMO is an electron acceptor. The energy gap ($E_{\text{HOMO}} - E_{\text{LUMO}}$) represents the chemical reactivity of compounds. For a system, a lower value of energy gap between the frontier molecular orbital makes it more reactive or less stable [32–36].

H_2L^2 has a larger energy gap than H_2L^1 . The energy gap, ($E_{\text{HOMO}} - E_{\text{LUMO}}$), is directly involved in the hardness/softness of a chemical species. A higher value of energy gap represents more hardness or less softness of a compound; thus H_2L^2 is referred to as a hard molecule and the stability order is: H_2L^2 (0.11089 a.u.) > H_2L^1 (0.09257 a.u.). The global reactivity descriptor chemical potential (I),

which is represented by HOMO energy, occurs from the charge distribution between two systems having different chemical potentials. The ionization potential (I) of H_2L^1 and H_2L^2 are 0.20830 a.u. and 0.22282 a.u., respectively as shown in Table 3, which clearly indicates that the ligand H_2L^2 has more tendency to donate electrons than H_2L^1 . Another global reactivity descriptor electrophilicity index (ω) describes the electron accepting ability of the systems quite similar to (η) and (I). High values of the electrophilicity index increase the electron accepting abilities of the molecules. Thus, the ligand H_2L^1 is found to be strongest nucleophile, whereas the ligand H_2L^2 is the strongest electrophile. The values of electronic chemical potential for two Schiff bases H_2L^1 and H_2L^2 are presented in Table 3, the greater electronic chemical potential (absolute values), the less stable or more reactive. The trend in

Table 3
Comparison of HOMO, LUMO, related molecular properties of $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^1$ and $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^2$ (a.u).

Molecular energy	$\mathbf{H}_2\mathbf{L}^1$	$\mathbf{H}_2\mathbf{L}^2$
Ionization Potential (I)	0.20830	0.22282
Electron affinity (A)	0.03147	0.00103
Chemical potential (μ)	-0.11572	-0.11192
Electronegativity (χ)	0.11572	0.11192
Chemical hardness (η)	0.09257	0.11089
Softness (S)	5.40131	4.50876
Electrophilicity index (ω)	0.07232	0.05647
E_{HOMO}	-0.20830	-0.22282
$E_{\text{HOMO}-1}$	-0.23163	-0.23584
E_{LUMO}	-0.02314	-0.00103
$E_{\text{LUMO}+1}$	-0.02041	-0.00179
$E_{\text{HOMO}}-E_{\text{LUMO}}$	0.18516	0.22179
$E_{\text{HOMO}-1}-E_{\text{LUMO}+1}$	0.20236	0.23409

$$I = -E_{\text{HOMO}}, A = -E_{\text{LUMO}}, \mu = 1/2(E_{\text{HOMO}} + E_{\text{LUMO}}), S = 1/2 \eta$$

$$\chi = -(E_{\text{LUMO}} + E_{\text{HOMO}})/2, \eta = 1/2(E_{\text{LUMO}} - E_{\text{HOMO}}), \omega = \mu^2/2\eta.$$

electronic chemical potential is $|\mu_{\mathbf{H}_2\mathbf{L}^1}| > |\mu_{\mathbf{H}_2\mathbf{L}^2}|$.

The calculated dipole moment for Schiff base ligands $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^1$ and $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^2$ (Table 3) shows that the value of dipole moment of $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^1$ (4.8359 debye) > $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^2$ (3.7465 debye). It is well known that the higher value of dipole moment is important for more active Non-Linear Optical (NLO) properties.

The distribution of electron density of both compounds is shown in the following Fig. 4.

Polarisability $\langle\alpha\rangle$, anisotropy of polarisability $\Delta\alpha$ and hyperpolarisability β_{tot} characterize the non-linear optical properties (NLO) of the system properties in an applied electric field [37]. In order to investigate the relationships among photocurrent generation, molecular structure and NLO, the polarisabilities, anisotropy of polarisabilities and hyperpolarisabilities of the title compounds were calculated using the DFT with B3LYP 6-31G (d,p) method (Table 4). The mean polarisability $\langle\alpha\rangle$ for $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^1$ and $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^2$ are -94.461 and -78.713 (a.u), respectively. The anisotropy of polarisability $\Delta\alpha$ is calculated as 14.6209 and 15.9053 (a.u) for $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^1$ and $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^2$, respectively. According to present calculations, the mean polarisability and anisotropy of polarisability of $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^2$ is found

Table 4
The B3LYP/6-31G (d,p) calculated electric dipole moments (Debye), polarisability (in a.u), β components and β_{tot} value of $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^1$ and $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^2$.

Parameters	$\mathbf{H}_2\mathbf{L}^1$	$\mathbf{H}_2\mathbf{L}^2$
μ_x	1.1022	3.2962
μ_y	2.5872	1.7738
μ_z	3.9341	-0.1569
μ_{tot}	4.8359	3.7465
α_{xx}	-88.2427	-75.9388
α_{yy}	-96.4853	-79.8814
α_{zz}	-96.0091	-80.3211
α_{xy}	-3.7842	-5.5620
α_{xz}	5.4331	2.8195
α_{yz}	-1.5671	-0.5313
$\langle\alpha\rangle$	-94.461	-78.713
$\Delta\alpha$	14.6205	15.9053
β_{xxx}	39.7627	56.0566
β_{xxy}	16.7141	-4.2013
β_{xyy}	10.7854	12.3393
β_{yyy}	28.5613	10.7953
β_{xxz}	35.7032	-6.7836
β_{xyz}	-14.7787	1.3027
β_{yyz}	-3.4751	-1.2531
β_{xzz}	-5.8783	-9.4651
β_{yzz}	-14.0744	-2.6485
β_{zzz}	9.4735	-6.3036
β_{tot}	68.611	60.771

higher than $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^1$, calculated at the same level of theory as well as same basis set 6-31G (d,p). This is related very well to the smaller frontier orbital energy gap of $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^1$ as compared to $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^2$. The total first hyperpolarisability values (β_{tot}) are 68.611 and 60.771 (a.u) for $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^1$ and $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^2$, respectively. The results indicate that $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^1$ possesses better nonlinear optical properties and it is a potential candidate for nonlinear optical applications than $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^2$.

3.3.5. Mulliken atomic charges

Mulliken atomic charge calculation has an important role in the application of quantum chemical calculation to molecular system because the atomic charges exert a direct effect on dipole moment, molecular polarisability, electronic structure and more a lot of properties of molecular systems [38]. The charge distributions over the atoms suggest the formation of donor and acceptor pairs involving the charge transfer in the molecule. The Mulliken atomic charges for the ligands $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^1$ and $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^2$ calculated at the B3LYP/6-31G (d,p) method are presented in Table S5 and the bar diagrams of atomic charges are shown in Fig. 5. It is worthy to mention that C1/C6/C13/C18 and C1/C5/C20/C21 atoms of the $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^1$ and $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^2$, respectively, show positive charge while the other carbon atoms exhibit negative charge. However, all the hydrogen atoms display a net positive charge. Mulliken atomic charges also show that the H atoms attached to the atoms of sulfur have bigger positive atomic charges than the other hydrogen atoms. This is may be due to the presence of electronegative sulfur atoms. The Mulliken charge distribution shows that the azomethine nitrogen atom N is more negative as compared to the other atoms in all selected compounds.

3.3.6. Analysis of molecular electrostatic potential

The molecular electrostatic potential (MEP) provides a visual method to understand the relative polarity of a molecule, electrostatic potential (electron + nuclei) distribution [39] and to find the reactive sites of molecules [40,41]. Electrostatic potential maps illustrate the charge distributions of molecules three dimensionally. For this purpose, the MEPs have been calculated for $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^1$ and $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^2$ at the B3LYP/6-31G (d,p) level. In the MEP plots, The total electron density mapped with electrostatic potential surface of the ligands are shown in Fig. 6A, The MEP mapped surface and electrostatic

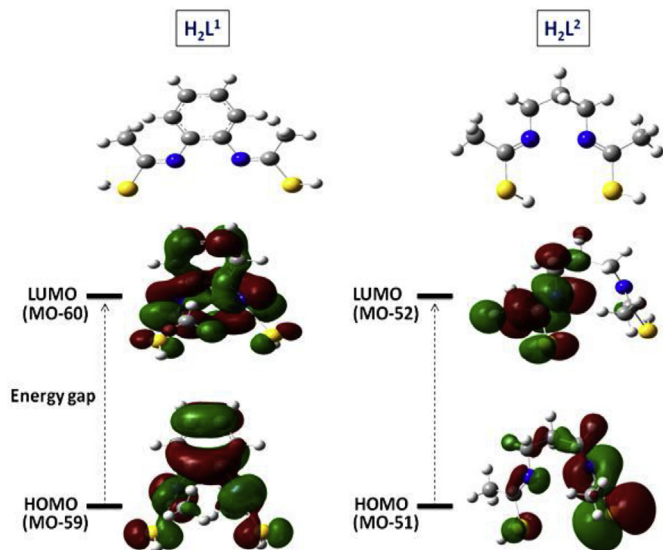


Fig. 4. Patterns of the HOMO, LUMO orbital's of $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^1$ and $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^2$ obtained with DFT-B3LYP/6-31G (d,p) method.

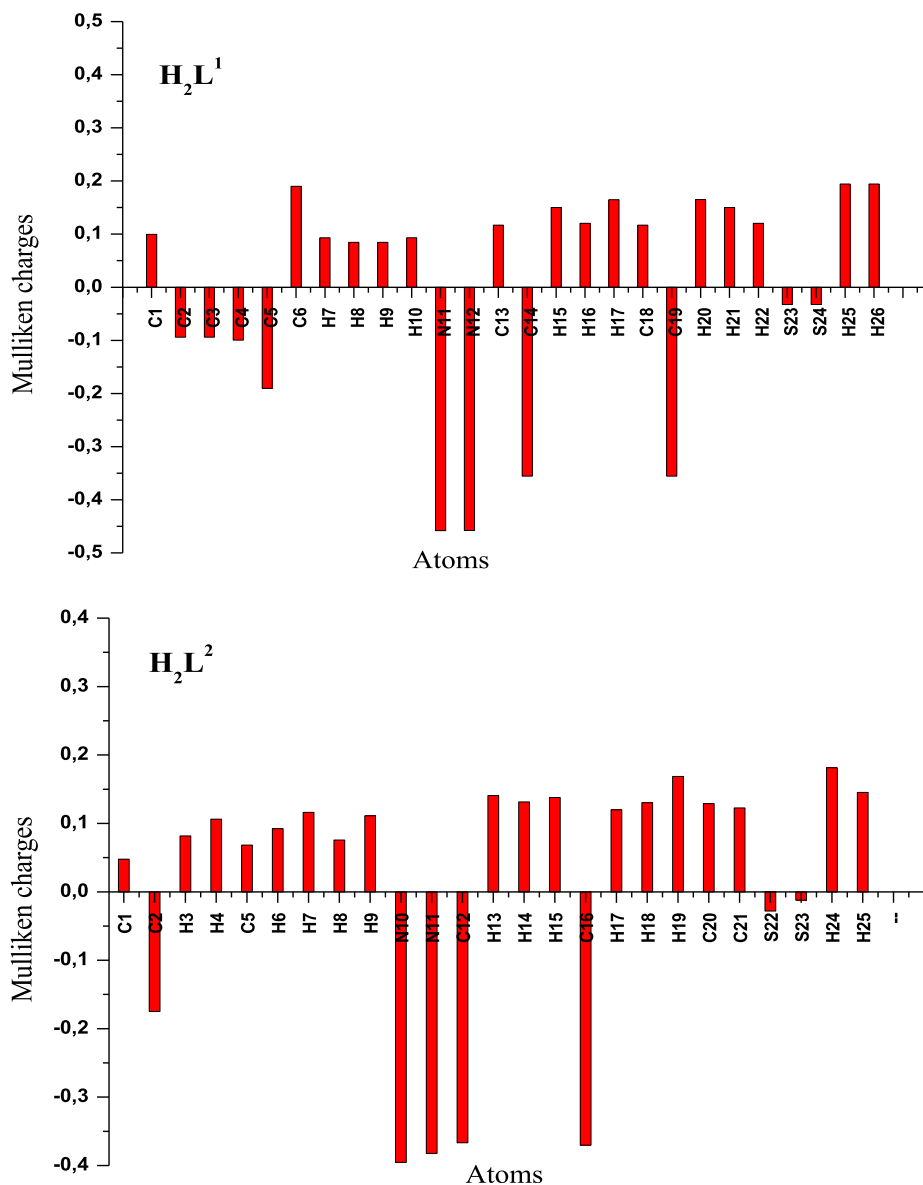


Fig. 5. The Mulliken atomic charge distribution of H_2L^1 and H_2L^2 .

potential contour map for positive and negative potentials are also shown in Fig. 6B and C. As represented in Fig. 6A and C, the negative regions represented by the red color are the preferable sites for electrophilic attack, and the positive regions represented by the blue color are favorable sites for nucleophilic attack. Here, the negative potentials are generated over the electronegative sulfur atoms S23, S24 and nitrogen atoms N10, N11, whereas the H-atoms have a positive potential region in the structures. These negative and positive sites help to predict the regions in a compound responsible for non-covalent interactions [42].

3.3.7. Thermodynamic properties

The thermodynamic parameters at rotational constants, standard temperature and pressure (298.15 K and 1 atm) for the ligands were also obtained using DFT-B3LYP/6-31-G (d,p) method are listed in Table 5. The global minimum energy obtained for H_2L^1 and H_2L^2

are -1293.845 and -1180.847 a.u., respectively. The thermodynamic data provides helpful information for the further study on the title compound, when these may be used as a reactant to take part in a new reaction.

3.4. Inhibition of metallo-beta-lactamases

3.4.1. Confirmatory tests of MBLs production

The positive result of CDT, inhibition by EDTA (3.98 mM), insensitivity to clavulanic acid and the ability to hydrolyze all classes of betalactams except aztreonam establishes the enzyme as a metallo-beta-lactamase as above described [17].

3.4.2. Kinetic parameters determined for metallo-beta-lactamases

As expected, semi-purified metallo-beta-lactamase efficiently hydrolyzed all tested b-lactam antibiotics including

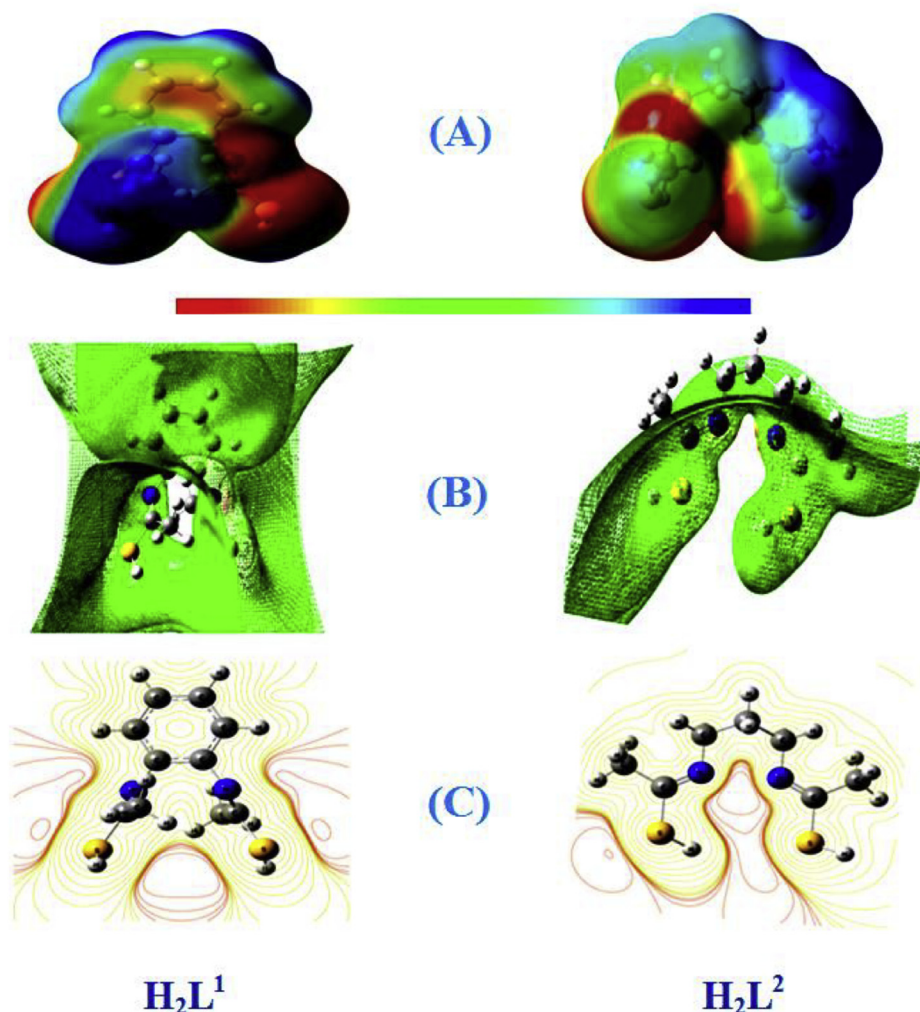


Fig. 6. (A) The total electron density surface mapped with electrostatic potential (MEP) plot of H_2L^1 and H_2L^2 . Isovalue = 0.0004. Level of calculation: B3LYP/6-31G (d,p); (B) The electrostatic potential surface and (C) the contour map of electrostatic potential of H_2L^1 and H_2L^2 .

Table 5
Calculated thermodynamic parameters of H_2L^1 and H_2L^2 employing B3LYP/6-31G (d,p) method.

	H_2L^1	H_2L^2	
SCF (a.u)	-1293.845	-1180.847	
Dipole moment (Debye)			
X	1.1022	3.9584	
Y	2.5872	2.5377	
Z	3.9341	-0.3943	
TOT	4.8359	4.7185	
Zero-point vibrational energy (Joules/Mol)	518654.3	533154.0	
	E (Thermal) KCal/Mol	CV Cal/Mol-Kelvin	S Cal/Mol-Kelvin
H_2L^1			
Total	133.581	55.493	127.238
Electronic	0.000	0.000	0.000
Translational	0.889	2.981	42.123
Rotational	0.889	2.981	33.028
Vibrational	131.804	49.532	52.088
H_2L^2			
Total	136.446	50.292	123.256
Electronic	0.000	0.000	0.000
Translational	0.889	2.981	41.632
Rotational	0.889	2.981	31.763
Vibrational	134.669	44.331	49.861

benzylpenicillin, cephaloridin and imipenem except aztreonam (monobactam) (Table S6). From these results, cephaloridin was the best substrate that showed the highest activity ($V_{max}/K_m = 8.80 \pm 0.014$). The enzyme showed low activity and less affinity for imipenem than other.

3.4.3. Inhibition activity of schiff base ligands on MBLs

The IC_{50} values of EDTA, Schiff base ligands H_2L^1 and H_2L^2 determined by linear computerized regression analysis after logit/log transformation, are 3.98 mM , 43.98 ± 1.00 and $58.96 \pm 1.74 \text{ }\mu\text{M}$, respectively (Table 6). These IC_{50} values reflect a significant inhibitory effect in comparison with standard inhibitor, EDTA. Furthermore, these Schiff base ligands H_2L^1 and H_2L^2 exert their inhibitory

Table 6
 IC_{50} values of the Schiff base ligands on MBLs of *Acinetobacter baumannii*.

Compounds	Interval Concentration tested	IC_{50}
EDTA	1 μM to 5 mM	3.98 mM
H_2L^1	1–80 μM	$43.98 \pm 1.00 \text{ }\mu\text{M}$
H_2L^2	1–100 μM	$58.96 \pm 1.74 \text{ }\mu\text{M}$

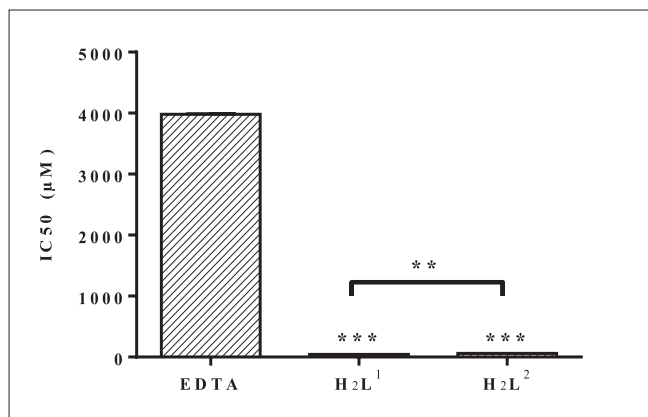


Fig. 7. In vitro percentage of inhibitory effect of **H₂L¹** and **H₂L²** on MBLs of *Acinetobacter baumannii*. Results are mean \pm SD ($n = 3$ independent replicates). Statistical significance of difference from corresponding control incubations' values: *** $P < 0.001$.

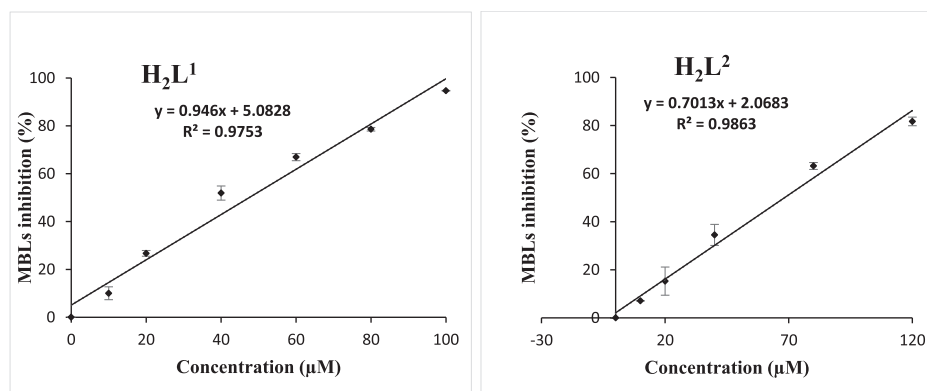


Fig. 8. Percentage inhibition of MBLs in the presence of increasing concentrations of Schiff base ligands: **H₂L¹** and **H₂L²**. Values are means \pm SD ($n = 3$).

effects on MBLs activity in a dose-dependent manner (Figs. 7 and 8).

According to the literature, the chelating agents including Schiff bases are used among others either as antimicrobial agents against bacteria producing beta-lactamases or not (Rebecca M. Christoff et al., 2017; Ozlem Ozdemir et al., 2016) [43,44] either as inhibitors of serine beta-lactamases (SBLs) (Subhas S. Karki et al., 2012) [45] or of MBLs (Ganesh More et al., 2017 [46]). In this case, the inhibitory effect is often quantified by inhibition percentage [47] as described by Ki [48] or with measured values of IC₅₀ parameter. Faridooon and Nazar UI Islam, in their review [49], have been summarized some inhibitors for the inhibition of MBLs with their related IC₅₀ values. As for the case of thiol derivatives, their IC₅₀ values were found to be varying from 0.4 nM to 1 µM. So, for some biphenyltetrazoles compared to their corresponding substituted derivatives, their IC₅₀ values varied between 0.3 µM and 860 µM. Recently, Anne Makena and her coworkers (2015) have been compared the inhibitory effects of Verona integron-borne metallo-lactamase (VIM) variants compounds containing different potential metal-chelating motifs [50] and they have found that their IC₅₀ values vary between 1 mM and 2 µM. Consequently, the comparison of the IC₅₀ values, obtained for our synthesized ligands, is closely found in the same ranges of those early reported in the literature.

4. Conclusion

In this work, two Schiff base ligands **H₂L¹** and **H₂L²** were synthesized and characterized. These ligands were revealed to have a good inhibition activity towards MBLs-enzymes and when their enzymatic activities were compared. It was found that the IC₅₀ value of **H₂L¹** ($43.98 \pm 1.00 \mu\text{M}$) is lower than those of **H₂L²** ($58.96 \pm 1.74 \mu\text{M}$), the enzymatic activity of **H₂L¹** is more higher. The molecular structures of these ligands were optimized by DFT-calculations using B3LYP/6-31G (d,p) method. Their optimized geometry, frontier orbitals (HOMO, LUMO), band gap, Mulliken atomic charge, molecular electrostatic potential (MEP), non-linear optical properties (NLO) and thermodynamic properties were determined. The results indicates that the ligand **H₂L¹**, with smaller energy gap (HOMO, LUMO), is softer, less stable, strongest electrophile and more reactive than **H₂L²**. From the theoretical calculations carried out for the studied molecules **H₂L¹** and **H₂L²**, it can be concluded that the electronic properties are well correlated with their experimental results.

Acknowledgements

The authors would like to thank the MESRS and DG-RSDT (Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique et la Direction Générale de la Recherche et du Développement Technologique- Algérie) for their financial support.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2018.06.044>.

References

- [1] S.R. Evans, A.M. Hujer, H. Jiang, K.M. Hujer, T. Hall, C. Marzan, M.R. Jacobs, R. Sampath, D.J. Ecker, C. Manca, K. Chavda, P. Zhang, H. Fernandez, L. Chen, J.R. Mediavilla, C.B. Hill, F. Perez, A.M. Caliendo, V.G. Fowler Jr., H.F. Chambers, B.N. Kreiswirth, R.A. Bonomo, Rapid molecular diagnostics, antibiotic treatment decisions, and developing approaches to inform empiric therapy: PRIMERS I and II. *Clin. Infect. Dis.* 62 (2016) 181–189.
- [2] E.P. Abraham, E. Chain, An enzyme from bacteria able to destroy penicillin, *Nature* 146 (1940) 837–838.
- [3] K.K. Kumarasamy, M.A. Toleman, T.R. Walsh, J. Bagaria, F. Butt, R. Balakrishnan, Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study,

- Lancet Infect. Dis. 10 (2010) 597–602.
- [4] G. Suresh Joshi, M. Geeta, B.L. Krishnarao Niphadkar, S. Vikram Ghole, Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from a teaching hospital, J. Infect. Chemother. 9 (2003) 187–190.
- [5] W. Al Zoubi, Y. Gun Ko, Schiff base complexes and their versatile applications as catalysts in oxidation of organic compounds: part I, Appl. Organomet. Chem. (2016) 1–12.
- [6] Y. Zidane, A. Ourari, T. Bataille, P. Hapiot, D. Hauchard, Electrochemical study with cavity microelectrode containing clay-supported Mn(III) salen complex - dioxxygen activation with cytochrome P450 model, J. Electroanal. Chem. 641 (2010) 64–70.
- [7] P. Przybylski, A. Huczynski, K. Pyta, B. Brzezinski, F. Bartl, Biological properties of schiff bases and azo derivatives of phenols, Curr. Org. Chem. 13 (2009) 124–148.
- [8] K.H.M.E. Tehrani, M. Hashemi, M. Hassan, F. Kobarfard, Shohreh Mohebbi, Synthesis and antibacterial activity of schiff bases of 5-substituted isatins, Chin. Chem. Lett. 27 (2016) 221–225.
- [9] S.E. Harpstrite, S.D. Collins, A. Oksman, D.E. Goldberg, V. Sharma, Synthesis, characterization and antimalarial activity of novel schiff-base-phenol and naphthalene- amine ligands, Med. Chem. 4 (2008) 392–395.
- [10] M.S. Alam, J.H. Choi, D.U. Lee, Synthesis of novel Schiff base analogues of 4-amino- 1,5-dimethyl-2- phenylpyrazol-3-one and their evaluation for anti-oxidant and anti-inflammatory activity, Bioorg. Med. Chem. 20 (2012) 4103–4108.
- [11] L. Puccetti, G. Fasolis, D. Vullo, Z.H. Chohan, A. Scozzafava, C.T. Supuran, Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of cytosolic/tumor-associated carbonic anhydrase isozymes I, II, IX, and XII with Schiff bases incorporating chromone and aromatic sulfonamide moieties, and their zinc complexes, Bioorg. Med. Chem. Lett. 15 (2005) 3096–3101.
- [12] A. Ourari, K. Ouari, W. Moumeni, L. Sibous, G. Bouet, M. Khan, Unsymmetrical tetradentate schiff base complexes derived from 2,3-diaminophenol and salicylaldehyde or 5-bromosalicylaldehyde, Transit. Met. Chem. 31 (2006) 169–175.
- [13] C. Peng, P.Y. Ayala, H.B. Schlegel, M.J. Frisch, Using redundant internal coordinates to optimize equilibrium geometries and transition states, J. Comput. Chem. 17 (1996) 49–56.
- [14] P.J. Stephens, F.J. Devlin, C.F. Chablowski, M.J. Frisch, Ab initio calculation of vibrational absorption and circular dichroism spectra using density functional force fields, J. Phys. Chem. 98 (1994) 11623–11627.
- [15] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H.P. Hratchian, A.F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J.L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J.A. Montgomery Jr., J.E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J.J. Heyd, E. Brothers, K.N. Kudin, V.N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J.C. Burant, S.S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J.M. Millam, M. Klene, J.E. Knox, J.B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A.J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, R.L. Martin, K. Morokuma, V.G. Zakrzewski, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, S. Dapprich, A.D. Daniels, Ö. Farkas, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, J. Cioslowski, D.J. Fox, Gaussian 09, Revision A.02, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.
- [16] R.D. Dennington, T.A. Keith, J.M. Millam, Gauss View 5.0.8, Gaussian Inc, 2008.
- [17] S. Houchi, R. Mahdadi, Z. Messasma, F. Sahli, The inhibitory effect of methanolic and aqueous extracts of *Terminalia chebula* dried fruits on metallobetalactamases of *acinetobacter baumannii*, Int. J. Pharm. Pharmaceut. Sci. 6 (2014) 579–582.
- [18] A.A. Osowole, Syntheses and characterization of some tetradentate schiff-base complexes and their heteroleptic analogues, E-J. Chem. 5 (2008) 130–135.
- [19] A.D. Bansod, R.G. Mahale, A.S. Aswar, Synthesis, characterization and electrical conductivity of some bivalent metal complexes of ONS donor ligand, J. Indian Chem. Soc. 83 (2006) 777–781.
- [20] M. Montazerzohori, S. Khani, H. Tavakol, A. Hojjati, M. Kazemi, Synthesis, spectroscopic and thermal studies of some IIb group complexes with a new N₂-Schiff base ligand, Spectrochim. Acta 81 (2011) 122–127.
- [21] K.B. Gudasi, G.S. Nadagouda, T.R. Goudar, Synthesis, characterization and biological studies of dioxouranium (II) and thorium (IV) complexes of Schiff bases derived from 2-aminopyridine and acetophenones, J. Indian Chem. Soc. 376 (2006) 376–378.
- [22] S.E. Livingstone, J.E. Oluka, Metal chelates of ligands containing the ONS donor grouping, Part II.* metal chelates of schiff bases derived from β-diketones and α-N-Methyl-S-methylthiocarbamate, Transit. Met. Chem. 2 (1977) 190–194.
- [23] F.A. Cotton, C.W. Wilkinson, Advanced Inorganic Chemistry, third ed., Interscience publisher, New York, 1972.
- [24] G. Bratulescu, Introduction in Organic Compounds Spectroscopy, Sitech, Graiova, Romania, 2009.
- [25] P.S. Hariharan, S.P. Anthony, Substitutional group dependent color/fluorimetric sensing of Mn²⁺, Fe³⁺ and Zn²⁺ ions by simple Schiff base chemosensor, Spectrochim. Acta 136 (2015) 1658–1665.
- [26] Y. Kaya, C. Içsel, V.T. Yilmaz, O. Buyukgungor, A palladium(II) complex containing both carbonyl and imine oxime ligands: crystal structure, experimental and theoretical UV–vis, IR and NMR studies, Spectrochim. Acta 108 (2013) 133–140.
- [27] G.-D. Tanga, J.-Y. Zhao, R.-Q. Li, Z.-C. Yuan-Cao, Zhang, Synthesis, characteristic and theoretical investigation of the structure, electronic properties and second-order nonlinearity of salicylaldehyde Schiff base and their derivatives, Spectrochim. Acta 78 (2011) 449–457.
- [28] J.B. Foresman, A. Frisch, Exploring Chemistry with Electronic Structure Methods, Gaussian, Pittsburg, Pa, USA, 1995.
- [29] L. Pauling, The Nature of the Chemical Bond, Cornell University Press, Ithaca, NY, USA, 1960.
- [30] P. Senet, Chemical hardnesses of atoms and molecules from frontier orbitals, Chem. Phys. Lett. 275 (1997) 5–6, 527–532.
- [31] R.G. Parr, R.G. Pearson, Electronegativity and bond energy, J. Am. Chem. Soc. 105 (26) (1983) 7512–7516.
- [32] F. Fukui, T. Yonezawa, C. Nagata, H. Shingu, Molecular orbital theory of orientation in aromatic, heteroaromatic, and other conjugated molecules, J. Chem. Phys. 20 (1954) 1433–1441.
- [33] Z. Zhou, R.G. Parr, Activation hardness: new index for describing the orientation of electrophilic aromatic substitution, J. Am. Chem. Soc. 112 (1990) 5720–5724.
- [34] R.G. Pearson, Absolute electronegativity and hardness: applications to organic chemistry, J. Org. Chem. 54 (1989) 1423–1430.
- [35] B.A. Hess Jr., L.J. Schaad, Hueckel molecular orbital, pi. resonance energies. Benzenoid hydrocarbons, J. Am. Chem. Soc. 93 (1971) 2413–2416.
- [36] C. Zhang, Y. Shu, Y. Huang, X. Zhao, H. Dong, Investigation of correlation between impact sensitivities and nitro group charges in nitro compounds, J. Phys. Chem. B 109 (2005) 8978–8982.
- [37] P.M. Anbarasan, P.S. Kumar, K. Vasudevan, R. Govindan, A. Prakasam, M. Geetha, Geometrical, electronic structure, nonlinear optical and spectroscopic investigations of 4-(phenylthio)phthalonitrile dye sensitizer for solar cells using quantum chemical calculations, Eur. J. Chem. 2 (2011) 206–213.
- [38] J.G. Maiecki, Synthesis, crystal, molecular and electronic structures of thiocyanate ruthenium complexes with pyridine and its derivatives as ligands, Polyhedron 29 (2010) 1973–1979.
- [39] A.E. Reed, F. Weinhold, Natural localized molecular orbitals, J. Chem. Phys. 83 (1985) 1736–1740.
- [40] E. Scrocco, J. Tomasi, Topics in Current Chemistry, Springer, Berlin, 1973, 7.
- [41] F.J. Luque, J.M. Lopez, M. Orozco, Perspective on Electrostatic interactions of a solute with a continuum. A direct utilization of ab initio molecular potentials for the prevision of solvent effects, Theor. Chem. Acc 103 (2000) 343–345.
- [42] S.Y. Ebrahimipour, M. Abaszadeh, J. Castro, M. Seifi, Synthesis, X-ray crystal structure, DFT calculation and catalytic activity of two new oxido-vanadium(V) complexes containing ONO tridentate Schiff bases, Polyhedron 79 (2014) 138–150.
- [43] R.M. Christoff, G.L. Murray, X.P. Kostoulas, A.Y. Peleg, B.M. Abbott, Synthesis of novel 1,2,5-oxadiazoles and evaluation of action against *Acinetobacter baumannii*, Bioorg. Med. Chem. 25 (2017) 6267–6272.
- [44] Ö. Özdemir, P. Gürkan, B. Özçelik, Ö. Oyard, Synthesis and antimicrobial activities of new higher amino acid Schiff base derivatives of 6-aminopenicillanic acid and 7-aminocephalosporanic acid, J. Mol. Struct. 1106 (2016) 181–191.
- [45] S.S. Karki, A.A. Kulkarni, S. Thota, S. Nikam, A.S. Kamble, N.D. Dhawale, Synthesis, antimicrobial screening and beta lactamase inhibitory activity of 3-(3-chloro-4-fluorophenylimino) indolin-2-on and 5-chloroindolin-2-on derivatives, Turk J. Pharm. Sci. 9 (2012) 353–358.
- [46] G. More, D. Raut, K. Aruna, S. Bootwala, Synthesis, spectroscopic characterization and antimicrobial activity evaluation of new tridentate Schiff bases and their Co(II) complexes, J. Saudi Chem. Soc. 21 (2017) 954–964.
- [47] Faridooon, W.M. Hussein, P. Vella, N.U. Islam, D.L. Ollis, G. Schenk, R.P. McGeary, 3-Mercapto-1,2,4-triazoles and N-acylated thiosemicarbazides as metallo-β-lactamase inhibitors, Bioorg. Med. Chem. Lett. 22 (2011) 380–386.
- [48] M.S. Mohamed, W.M. Hussein, R.P. McGeary, P. Vella, G. Schenk, R.H. Abd El-hameed, Synthesis and kinetic testing of new inhibitors for a metallo-β-lactamase from *Klebsiella pneumonia* and *Pseudomonas aeruginosa*, Eur. J. Med. Chem. 46 (2011) 6075–6082.
- [49] Faridooon, N.U. Islam, An update on the status of potent inhibitors of metallo-β-lactamases, Sci. Pharm. 81 (2013) 309–327.
- [50] A. Makena, A.Ö. Düzgün, J. Brem, M.A. McDonough, A.M. Rydzik, M.I. Abboud, A. Saral, A.Ç. Çiçek, C. Sandalli, C.J. Schofield, Comparison of Verona integron-borne metallo-β-lactamase (VIM) variants reveals differences in stability and inhibition profiles, Antimicrob. Agents Chemother. 60 (2015) 1377–1384.

ملخص

ما مجموعه خمس ربيطات قواعد شيف H_2L الرباعية N_2S_2 و N_2O_2 (H_2L^1 بجسر 2,3-diaminopyridine و H_2L^2 و H_2L^3 بجسر 1,2-diaminobenzene و H_2L^4 بجسر 1,3-diaminopropyle و H_2L^5 بجسر 1,2-diaminoéthyle) ومركباتها مع الزنك تم بناؤها ودراسة ميزاتنا بالطرق الفيزيائية الكيميائية الروتينية وهي درجة حرارة الإنصهار، الذوبانية، الناقلية المولارية، المقايسة الضوئية الطيفية من النوع UV-Vis، FT-IR، RMN^1H ، $RMN^{13}C$ ، والتحليل العنصري الكيميائي. تكتشف أن هذه الجزيئات مستقرة، قابلة للذوبان في المذيبات العضوية باستثناء H_2L^1 ومعقدته، عديمة الناقلية، بناها مطابقة للبنية المقترحة و كلها تستخلب عنصر الزنك. تم حساب بنى H_2L^2 - H_2L^5 وخصائصها الإلكترونية في الطور الغازي باستخدام نظرية الكثافة الوظيفية (DFT) باستعمال طريقة B3LYP/6-31G (d, p). أظهرت الحسابات أن الربيطه H_2L^2 هي الأكثر تفاعلية لأنها تملك أصغر فجوة في الطاقة. استخدمت المركبات H_2L^2 - H_2L^5 كمثبطات للانزيم metallo- β -lactamase منقى جزئيا من *A. baumannii* و تبين أن لديها تأثير مثبط ($IC_{50} \leq 58.96 \mu M$) يفوق التأثير المثبط لـ EDTA ($IC_{50} = 3.98 mM$). عند المقارنة بين فجوات طاقاتها (HOMO, LUMO) و تفاعليتها وقيم IC_{50} ، نلاحظ أنه كلما انخفضت قيمة فجوة الطاقة كلما ازدادت تفاعليتها و انخفضت قيمة IC_{50} و كان المركب أكثر فعالية. تم أيضا اختبار الربيطات نفسها ومركباتها مع الزنك كعوامل مضادة للنمو البكتيريا و أظهرت النتائج أن هذه الجزيئات نشطة على نمو البكتيريا G^+ وغير نشطة على نمو البكتيريا G^- بما في ذلك *A. baumannii*. يبدو أن الجدار البكتيري الأكثر تطوراً عند هذه الاخيرة، يحد من دخول الجزيء إلى الخلية البكتيرية وإعطاء تأثير قاتل للبكتيريا أو مثبط نموها.

كلمات مفتاحية: ربيطات قواعد شيف، معقدات الزنك، DFT، metallo- β -lactamase، مضاد بكتيري، *A. baumannii*.

Résumé

Un totale de cinq ligands bases de Schiff H_2L tétradentates N_2O_2 et N_2S_2 (H_2L^1 au pont 2,3-diaminopyridine, H_2L^2 et H_2L^3 aux pont 1,2-diaminobenzene, H_2L^4 au pont 1,3-diaminopropyle et H_2L^5 au pont 1,2-diaminoéthyle) et leurs complexes de zinc ont été synthétisés et caractérisés par les méthodes physico-chimiques de routine à savoir la température de fusion, la solubilité, la conductance molaire, la spectrophotométrie UV-Vis, l'IR-FT, la RMN^1H , la $RMN^{13}C$ et l'analyse élémentaire. Ces molécules se sont avérées stables, solubles dans les solvants organiques à l'exception du H_2L^1 et de son complexe, non électrolytes, de structures conformes à celles proposées et chélateurs du zinc. Les structures des H_2L^2 - H_2L^5 et leurs propriétés électroniques ont été calculés en phase gazeuse en utilisant la théorie de la densité fonctionnelle (DFT) via la méthode B3LYP/6-31G (d, p). Les calculs réalisés montrent que le ligand H_2L^2 est le plus réactif car il a le plus petit gap énergétique. Les ligands H_2L^2 - H_2L^5 ont été utilisés comme inhibiteurs vis-à-vis d'une metallo- β -lactamase (MBL) semi-purifiée à partir d'*Acinetobacter baumannii* et se sont révélés douer d'effet inhibiteur significatif sur ($IC_{50} \leq 58.96 \mu M$) par rapport à l'inhibiteur standard, l'EDTA ($IC_{50} = 3.98 mM$). Un recoupement entre leurs écarts énergétiques (HOMO, LUMO), leurs réactivités et leurs IC_{50} , révèle que plus l'écart énergétique diminue, plus la réactivité augmente, plus l' IC_{50} diminue et plus est efficace le ligand. Les mêmes ligands et leurs complexes de zinc ont été également testés comme agents antibactériens. Les tests ont montré que ces molécules sont actifs sur la croissance les bactéries G^+ mais inactifs sur celle des bactéries G^- y compris *A. baumannii*. La paroi bactérienne plus développée chez celles-ci, limite apparemment la pénétration de la molécule dans la cellule bactérienne et par conséquent son action bactériostatique ou bactéricide.

Mots clés : Ligands bases de Schiff, complexe de zinc, DFT, metallo- β -lactamase, activité antibactérienne, *A. baumannii*.

Abstract

A total of five Schiff bases ligands H_2L tetradentate N_2O_2 and N_2S_2 (H_2L^1 at the 2,3-diaminopyridine bridge), (H_2L^2 and H_2L^3 based at the 1,2-diaminobenzene bridge), (H_2L^4 at the 1,3-diaminopropyl bridge) and (H_2L^5 at the 1,2-diaminoethyl bridge) and their zinc complexes have been synthesized and characterized by routine physicochemical methods namely the melting temperature, solubility, molar conductance, UV-Vis spectrophotometry, IR-FT, NMR^1H , $NMR^{13}C$ and elemental analysis. These molecules proved to be stable, soluble in organic solvents with the exception of H_2L^1 and its complex, non-electrolytes, of structures conforming to those proposed and chelating zinc. The structures of H_2L^2 - H_2L^5 and their electronic properties were calculated in the gas phase using functional density theory (DFT) via the B3LYP/6-31G (d, p) method. Calculations show that the ligand H_2L^2 is the most reactive because it has the smaller energy gap. The ligands H_2L^2 - H_2L^5 have been used as inhibitors against a semi-purified metallo-beta-lactamase (MBL) from *Acinetobacter baumannii* and have been shown to have a significant inhibitory effect ($IC_{50} \leq 58.96 \mu M$), compared to the standard inhibitor, EDTA ($IC_{50} = 3.98 mM$). An overlap between their energy differences (HOMO, LUMO), their reactivities and their IC_{50} , reveals that the more the energy gap decreases, the more the reactivity increases, the more the IC_{50} decreases and the more the ligand is effective. The same ligands and their zinc complexes were also tested as antibacterial agents. Tests have shown that these molecules are active on G^+ bacteria growth but inactive on G^- bacteria including *A. baumannii*. The bacterial wall more developed in them, obviously limits the penetration of the molecule in the bacterial cell and consequently its bacteriostatic or bactericidal action.

Keywords : Schiff bases ligands, zinc complexes, DFT, metallo-beta-lactamase, antibacterial activity, *A. baumannii*.