

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

Université Abderrahmane MIRA de Bejaia
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie

MEMOIRE De Magister

Option : Microbiologie Appliquée

THEME

**Essai de caractérisation biochimique d'un mécanisme
de résistance par β -lactamases d'une souche
hospitalière d'*Acinetobacter baumannii***

Réalisé par : M^{lle} YOUSFI Khadidja

Membres de Jury :

| | | |
|-----------------------------------------|--------------------------|---------------------|
| M^r . ZAIDI F. | M.C. A (UAMB) | Président |
| M^r . BENALLAOUA S. | Professeur (UAMB) | Promoteur |
| M^r . TOUATI A. A. | M.C.A (UAMB) | Co-promoteur |
| M^r . KECHA. M | M.C. A (UAMB) | Examineur |
| M^r . TAMENDJARI. A. R | M.C. A (UAMB) | Examineur |

Janvier 2010

Remerciements

Je remercie Dieu le tout puissant pour m'avoir donné le courage et la patience de réaliser ce travail.

Je remercie Mr. ZAIDI F. qui me fait l'honneur, de présider ce jury.

Je remercie Mr. KECHA M. et Mr. TAMENDJARI A. R. qui me font l'honneur de juger ce travail.

J'adresse mes remerciements à Mr. BENALLAOUA S. pour m'avoir encadré, en me faisant bénéficier de ses connaissances et de ses conseils. qu'il trouve ici tout mon respect et ma gratitude.

Je tiens également à remercier très chaleureusement Mr TOUATI A. pour sa disponibilité, son aide et pour ses conseils qu'il trouve ici toute ma gratitude.

Je remercie très chaleureusement Farida, Fahima, Fatiha, Meriem et mes camarades surtout Karima et Mohamed pour leur aide inestimable, leurs encouragements et leurs conseils.

Enfin, mes remerciements s'adressent à toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de ce travail particulièrement Mr. BELHADI D. qui ma aidé dans les moments les plus difficiles que Dieu le protège.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

Ceux qui me sont les plus chers au monde : A la mémoire de ma mère, qui m'a souvent encouragée et m'a toujours souhaitée la réussite. A mon père, que Dieu le protège et lui prête une longue et heureuse vie.

Mes chers frères et leur maries et ma chère sœur et son mari Rabah à mes tantes et à mes oncles .

Mes chères nièces et neveux .

Mes copines

Mes voisines

Toute la promotion de Magister, Microbiologie appliquée .

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction 01

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I. β -lactamines

1. Historique des β -lactamines..... 03

2. Classification et structure des β -lactamines 04

2.1. Dérivés de l'acide 6-amino-pénicillanique..... 04

2.1.1. Pénames (ou pénicillines)..... 05

2.1.2. Carbapénèmes..... 07

2.1.3. Oxapénames ou clavames..... 07

2.2. Dérivés de l'acide 7-amino-céphalosporanique 08

2.2.1. Céphalosporines 09

2.2.2. Céphamycines..... 12

2.2.3. Oxacéphèmes..... 13

2.3. Monobactames..... 13

3. Inhibiteurs des β -lactamases appartenant aux β -lactamines..... 13

4. Mode d'action des β -lactamines 15

II . β -lactamases

1. Généralités..... 16

2. Nomenclature et classification des β -lactamases 16

2.1. Nomenclature..... 16

2.2. Classification..... 17

2.2.1. Classification fonctionnelle (classification de Bush, Jacoby et Medeiros) 18

2.2.2. Classification moléculaire (classification d'Ambler)..... 20

3. Structures et fonction des β -lactamases..... 22

3.1. Caractéristiques structurales de β -lactamases à serine 22

3.2. Caractéristiques structurales des métallo- β -lactamases (MBLs)..... 24

3.3. Cinétiques et mécanisme d'hydrolyse et d'inhibition des β - lactamases 25

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.3.1. β -lactamses à serine | 25 |
| 3.3.2. Mécanisme des métallob- β -lactamses | 27 |
| 4. Mécanisme d'inhibition de β-lactamses à sérine..... | 27 |
| 5. Evolution des β-lactamses | 28 |

Chapitre II : Matériel et méthodes

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1. Souche bactérienne | 30 |
| 2. Milieux et réactifs | 30 |
| 3. Sensibilité aux antibiotiques et test de synergie..... | 31 |
| 4. Culture bactérienne et extraction de β-lactamses..... | 31 |
| 4.1. Culture bactérienne..... | 31 |
| 4.2. Extraction de β -lactamses | 32 |
| 5. Dosage des protéines..... | 32 |
| 6. Test de détection sur gel d'iode | 33 |
| 7. Etude de la cinétique enzymatique des β-lactamses | 34 |
| 7.1. Mesure de l'activité enzymatique..... | 34 |
| 7.2. Etude du profil d'inhibition | 35 |
| 8. Electrophorèse non dénaturante sur gel polyacrylamide et zymogramme..... | 35 |

Chapitre IV : Résultats et Discussions

| | |
|-----------------------------------------------------|-----------|
| 1. Sensibilité de la souche et DD-test..... | 37 |
| 2. Dosage des protéines..... | 37 |
| 3. Test de détection sur le gel d'iode | 38 |
| 4. Profils du substrat et d'inhibition | 39 |
| 4.1. Profil du substrat..... | 39 |
| 4.2. Profil d'inhibition | 42 |
| 5. Electrophorèse native et zymogramme..... | 51 |
| 6. Discussion | 52 |
| Conclusion et perspectives | 61 |

Références bibliographiques

Annexes

Liste des abréviations

7-ACA : 7-aminocéphalosporanique

AER : Aeromonas

AMX : Amoxicilline

ATM : Aztréonam

BcII : *Bacillus cereus* type II

BLSE : β -lactamase à spectre élargi

C1G : Céphalosporines de première génération

C2G : Céphalosporines de deuxième génération

C3G : Céphalosporines de troisième génération

CAZ : Ceftazidime

CcrA : CcrA Cefoxitin and carbapenem resistant

CLOX : Cloxacilline

CphA : Carbapenem hydrolyzing and first (A)

CPO : Cefpirome

CRO : Ceftriaxone

CTX : Céfotaxime

FEP : Céfépime

FOX : Céfoxitine

GIM : German imipenemase

IMP : Imipenème

L1 : Labile enzyme

MIR : Miriam Hospital

M β L : Métallo- β -lactamase

OXA : Oxacilline

PC1 : *Staphylococcus aureus* souche PC1

pCMB : *p*-chloromercuribenzoate

PEN : Pénicilline G

PER : Pseudomonas extended resistant

PIP : Pipéracilline

PIT : Pitton

PLP : Protéine liant pénicilline

RTG : Arginine, thréonine, glycine

SHV : Sulfhydryl reagent variable

SPM : Sao Paulo metallo- β -lactamase

TCC : Ticarcilline + acide clavulanique

TEM : Temoneira

TIC : Ticarcilline

TZP : Pepiracilline + tazobactam

YOU : Youville Hospital

Liste des figures

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figure 1 : Dérivés de l'acide 6-amino-pénicillanique | 05 |
| Figure 2: Quelques structures des pénicillines | 08 |
| Figure 3 : Dérivés de l'acide 7-amino-céphalosporanique et monobactames | 09 |
| Figure 4: Quelques structures de céphalosporines | 12 |
| Figure 5 : Structure des inhibiteurs de β -lactamases | 14 |
| Figure 6 : Dendrogramme de β -lactamases à sérine..... | 20 |
| Figure 7: Structure des β -lactamases à sérine | 23 |
| Figure 8: Structure des métallo- β -lactamases | 24 |
| Figure 9 : Mécanisme moléculaire des β -lactamases à sérine..... | 26 |
| Figure 10: Mécanisme catalytique général des métallo - β - lactamases | 27 |
| Figure 11: Test de synergie de la souche d' <i>Acinetobacter baumannii</i> | 38 |
| Figure 12: Test de détection sur le gel d'iode | 39 |
| Figure 13: Variation de l'absorbance en fonction du temps à différentes concentrations en μ M | 41 |
| Figure 14: Variation de l'absorbance en fonction du temps à différentes concentrations en μ M | 42 |
| Figure 15: Pourcentage d'inhibition des β -lactamases par tazobactam (substrat pipéracilline)..... | 43 |
| Figure 16: Pourcentages d'inhibition par l'acide clavulanique (substrat ticarcilline)..... | 44 |
| Figure 17: Pourcentages d'inhibition par la cloxacilline (substrat pénicilline G)..... | 45 |
| Figure 18: Pourcentages d'inhibition par la cloxacilline (substrat pipéracilline)..... | 46 |
| Figure 19 : Pourcentages d'inhibition par la cloxacilline (substrat ticarcilline) | 47 |
| Figure 20 : Pourcentages d'inhibition par la cloxacilline (substrat céfazoline) | 48 |
| Figure 21 : Pourcentages d'inhibition par l'aztréonam (substrat pénicilline G) | 49 |
| Figure 22: Pourcentages d'inhibition par l'aztréonam (substrat céfazoline)..... | 50 |
| Figure 23: Diminution de l'absorbance en présence et en absence d' EDTA (substrat céfazoline)..... | 50 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figure 24: Diminution de l'absorbance en présence et en absence de NaCl (substrat céfazoline) | 50 |
| Figure 25: Gel d'électrophorèse et zymogramme | 51 |

Liste des tableaux

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tableau I : Classes moléculaires correspondant aux groupes fonctionnels | 17 |
| Tableau II: Les trois éléments fonctionnels des β -lactamases à serine | 23 |
| Tableau III : Ligands de zinc chez les métallo β -lactamases | 24 |
| Tableau IV: Antibiotiques utilisés pour l'étude cinétique | 31 |
| Tableau V: Longueurs d'onde et coefficients d'extinction molaire des antibiotiques testés..... | 35 |
| Tableau VI: Antibiogramme de la souche d' <i>Acinetobacter baumannii</i> | 38 |
| Tableau VII : Taux d'hydrolyse de TIC, PIP et CEZ par rapport à PEG | 40 |
| Tableau VIII: Vitesses d'hydrolyse de la pipéracilline en présence et en absence de tazobactam..... | 43 |
| Tableau IX : Vitesses d'hydrolyse de la ticarcilline en présence et en absence de l'acide clavulanique..... | 44 |
| Tableau X: Vitesses d'hydrolyse de pénicilline G à 200 μ M en présence de cloxacilline | 45 |
| Tableau XI: Vitesses d'hydrolyse de pipéracilline à 200 μ M en présence de la cloxacilline..... | 46 |
| Tableau XII: Vitesses d'hydrolyse de la ticarcilline à 200 μ M en présence de la cloxacilline..... | 47 |
| Tableau XIII: Vitesses d'hydrolyse de la cefazoline à 100 μ M en présence de la cloxacilline | 48 |
| Tableau XIV: Vitesses d'hydrolyse de pénicilline G à 200 μ M en présence de l'aztreonam..... | 49 |
| Tableau XV: Vitesses d'hydrolyse de la cefazoline à 100 μ M en présence de l'aztréonam | 40 |
| Tableau XVI: Vitesses d'hydrolyse de cefazoline à 100 μ M en présence d'EDTA..... | 51 |
| Tableau XVII : Vitesses d'hydrolyse de cefazoline à 100 μ M en présence de NaCl | 51 |
| Tableau XVIII: Pourcentages d'inhibition à 100 (CEZ) ou 200 μ M du substrat..... | 51 |
| Tableau XIX: Récapitulation de profil de substrat et d'inhibition de β -lactamases produites | 55 |

Introduction

Les maladies infectieuses demeurent la principale cause de décès malgré l'utilisation des antibiotiques pour leur traitement. La cause principale réside dans l'apparition de microorganismes pathogènes résistants aux antibiotiques (Essack, 2001).

Les β -lactamines représentent la principale famille d'antibiotiques la plus développée et la plus utilisée dans le monde. Cette large utilisation est due à leur large spectre d'action, leur faible toxicité, leur efficacité et leur faible coût pour certaines molécules (Demain et Elander, 1999 ; Buynak, 2006).

Les bactéries ont développé différents mécanismes pour empêcher l'action de ces antibiotiques, tels que la modification de la cible, la production de β -lactamases qui hydrolyse la liaison amide du cycle β -lactame de la famille des β -lactamines donnant un produit biologiquement inactif, l'acquisition ou la surproduction des pompes efflux qui peuvent expulser l'antibiotique hors de la cellule même contre le gradient de concentration et la modification des porines chez les bactéries Gram-négatif (Hawkey, 2000 ; Walsh et Wright, 2005).

Les β -lactamases constituent le principal mécanisme de résistance naturelle et acquise aux β -lactamines, en particulier chez les bactéries à Gram-négatif. Ces enzymes d'inactivation d'une extrême diversité peuvent être classées selon leurs profils de substrat et d'inhibition, leur support génétique (chromosome ou plasmides), leur poids moléculaire, leur point isoélectrique et selon leur homologie de séquences en acides aminés (Livermore, 1995 ; Philippon et Arlet, 2006).

Au début des années 1980, seules les enzymes plasmidiques TEM-1, TEM-2 et SHV-1 étaient connues. Les β -lactamases à spectre étendu (BLSE), SHV-2 et TEM-3 ont été découvertes à cette époque chez *Klebsiella pneumoniae*, soit peu après l'introduction en clinique des céphalosporines de troisième génération. En quelques années, les β -lactamases sont évoluées parallèlement à l'utilisation massive des β -lactamines (Rodriguez-Villalobos et Struelens, 2006).

On a constaté une rapide diversification accompagnée d'élargissement de leur spectre d'activité et leur diffusion parmi de nombreuses espèces d'entérobactéries et de

bacilles à Gam-négatif non fermentaires comme *Pseudomonas spp* et *Acinetobacter spp* (Rodriguez-Villalobos et Struelens, 2006)

Acinetobacter baumannii est une bactérie Gram négatif, non fermentaire, pathogène opportuniste responsable des infections nosocomiales graves, en particulier chez les patients des services de réanimation. La majorité des infections sont d'origine épidémique dont le traitement est devenu difficile en raison de la résistance des souches d'*Acinetobacter baumannii* à une large gamme d'antibiotiques, y compris les β -lactamines (Koeleman *et al.*, 2001 ; Jeong *et al.*, 2006).

Acinetobacter baumannii produit des céphalosporinases (AmpC, ADC-7), des pénicillinases à spectre large (TEM-1, SHV-1, SCO-1) ainsi que des β -lactamases à spectre élargi ou BLSE (Thomson *et al.*, 1990 ; Poirel *et al.* 2007; Nordmann et Poirel, 2008). Cependant la majorité des espèces d'*Acinetobacter* produisent des β - lactamases de la classe moléculaire D (OXA-23, -24, -25, -26, -48, -54). Récemment, des nouvelles sous-classes de métallob- β -lactamases ont été rapportés, dont SPM-1 et GIM-1 (Jeong *et al.*, 2006).

L'objectif de ce travail est une contribution à la caractérisation biochimique des β -lactamases d'une souche clinique d'*Acinetobacter baumannii* isolée en 2007 au niveau du laboratoire de bactériologie médicale du CHU de Tizi Ouzou.

Dans cette étude, on s'est particulièrement intéressé au profil du substrat et d'inhibition dans le but de déterminer la nature et le nombre d'enzymes produites par cette souche en adoptant la démarche expérimentale suivante :

- Etude de la sensibilité aux antibiotiques et présence de BLSE ;
- Détection de β -lactamases;
- Etude du profil du substrat et d'inhibition;
- Etude du profil électrophorétique couplée à une méthode iodométrique.

Chapitre I
Synthèse bibliographique

I . β -lactamines

Les β -lactamines sont une famille d'antibiotiques très importante utilisée pour le traitement de différentes maladies infectieuses causées par les bactéries à Gram négatif et à Gram positif. Ces antibiotiques représentent 65% des antibiotiques du marché mondial dont 50 molécules sont commercialisées (Poole, 2004). C'est le groupe le plus riche par sa diversité, l'efficacité et la bonne tolérance de ses représentants. Le plus ancien d'entre eux, la pénicilline G reste le médicament le plus prescrit. Sa structure de base est le point de départ de synthèse de très nombreux dérivés dont les pénèmes étant les plus récents (Moulin et Coquerel, 2002).

La structure de base des β -lactamines est le noyau azétidinone qui contient la structure carbonyle lactame (Figure 1), laquelle est indispensable pour l'activité des molécules. Sur cette structure est fixée un cycle penta-atomique saturé (pénème), insaturé (pénème) ou hexa-atomique (céphèmes) et le noyau azétidinone seul (β -lactamine monocyclique) (Bryskier, 1999 ; Williams, 1999).

1. Historique des β -lactamines

La découverte de l'activité antibactérienne produite par *Penicillium notatum* par Fleming en 1928, a représenté un événement extraordinaire en infectiologie et elle a permis de traiter de nombreuses infections. A cette époque, Fleming a réussi à préparer un extrait qu'il appela pénicilline (Gaudy et Buxeraud, 2005).

En 1940, Florey et ses collaborateurs, ont réussi à obtenir une pénicilline concentrée, partiellement purifiée et stable. Le premier cas de septicémie à staphylocoque a été traité en 1941 à Oxford et la structure biochimique du noyau de base de toutes les pénicillines, l'acide amino-6-pénicillanique a été déterminée en 1959 (Cavallo *et al.*, 2004).

Il a fallu modifier des molécules d'origine naturelle pour obtenir des antibiotiques semi-synthétiques possédant des propriétés bactériologiques et pharmacologiques encore plus intéressantes. En effet, la résistance de *Staphylococcus aureus* à la pénicilline devient un problème majeur au début des années 1960, affectant l'ensemble des hôpitaux et de plus, à partir de cette époque, les bacilles à Gram négatif prennent une place croissante en pathologie infectieuse. On prépara ainsi des pénicillines résistantes aux pénicillinases staphylococcis (méthicilline, 1960 ; oxacilline, 1962) et des pénicillines à large spectre

actives sur les bactéries à Gram négatif comme l'ampicilline (1963) ou la carbénicilline (1970) (Bryskier, 1999 ; Cavallo *et al.*, 2004).

Le deuxième groupe important de β -lactamines est celui des céphalosporines. La première céphalosporine, appelée céphalosporine C, a été isolée en 1945 à partir d'une moisissure (*Cephalosporium acremonium*) isolée en Sardaigne (Patrick, 2003).

L'acquisition de résistances à ces molécules stimula la recherche et la mise sur le marché de nouvelles molécules s'accéléra avec l'apparition des céphalosporines de troisième génération (céfotaxime, 1981), des carbapénèmes (imipénème, 1985) et des monobactames (aztréonam, 1986). En parallèle, de nouvelles pénicillines comme les uréidopénicillines (pipéracilline, 1981) et des combinaisons à des inhibiteurs de β -lactamases ont été préparées : amoxicilline-acide clavulanique en 1984, ampicilline-sulbactam en 1986 et pipéracilline-tazobactam en 1993 (Cavallo *et al.*, 2004).

L'utilisation massive et parfois abusive des antibiotiques, et des β -lactamines en particulier, a modifié considérablement l'écologie bactérienne. Les résistances de plus en plus fréquentes rencontrées chez les bactéries posent des difficultés et parfois des impasses en thérapeutique humaine (Cavallo *et al.*, 2004).

2. Classification et structure des β -lactamines

Les β -lactamines, qu'elles soient naturelles ou produites par hémisynthèse, sont classées en fonction de la nature du noyau entrant dans leur structure de base, qui comporte toujours le cycle β -lactame, cette structure permet de répartir ces produits en trois groupes: les dérivés de l'acide 6-amino-pénicillanique, les dérivés de l'acide 7-amino-céphalosporanique et les monobactames (Gazengel, 2001 ; Cavallo *et al.*, 2004).

2.1. Dérivés de l'acide 6-amino-pénicillanique

Leur noyau de base associe un cycle β -lactame à un cycle thiazolidine (figure1), spécifique des pénicillines. Il intègre le grand groupe des β -lactamines ayant un noyau pénème, caractéristique des pénicillines. Selon que le noyau est un pénème, un pénème ou un clavame (figure1) diverses substitutions confèrent à la molécule des propriétés et une activité antibactérienne variable qui s'exprime dans les variations du spectre d'activité antibactérienne (Cavallo *et al.*, 2004).

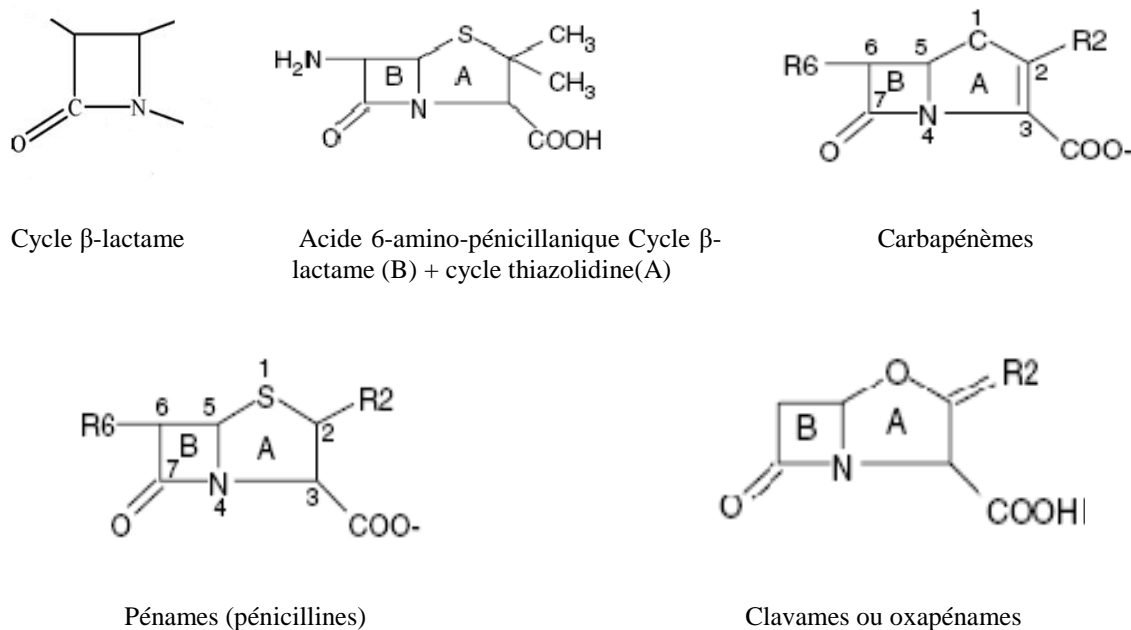


Figure 1 : Dérivés de l'acide 6-amino-pénicillanique (Cavallo *et al.*, 2004).

2.1.1. Pénames (ou pénicillines)

Il s'agit d'une vaste famille de produits ayant en commun le noyau péname qui est caractérisé par un pentacycle saturé associé au noyau β -lactame. Les produits de ce groupe se distinguent par la nature du radical fixé sur le carbone en position 6 (R_6) (figure 1). Ils se répartissent en cinq principaux sous groupes:

➤ Pénicilline G et ses dérivés

La benzylpénicilline (pénicilline G) (Figure 2) possède un acide phénylacétique en position 6. La modification de cette chaîne latérale par une liaison oxygène aboutit à des composés plus stables, comme les phénoxy méthylpénicillines (pénicillines V) (Figure 2) qui peuvent être utilisés par voie orale (Bryskier, 1999 ; Gaudy et Buxeraud , 2005).

➤ Pénicillines antistaphylococciques

L'apparition de souches de *Staphylococcus aureus* productrices de pénicillinases, a fortement limité l'intérêt de la pénicilline G et de ses dérivés pour le traitement des infections à staphylocoques d'où la nécessité de la synthèse de molécules stables à l'hydrolyse par ces enzymes (Bryskier, 1999 ; Essack, 2001).

L'addition de nouvelles chaînes en position 6 au noyau pénicilline empêche la fixation des pénicillinases des staphylocoques et ainsi d'obtenir des pénicillines qui résistent à l'hydrolyse. La première molécule synthétisée a été, la méthicilline (diméthoxybenzylpénicilline) qui diffère de la benzylpénicilline par la substitution en 2' et 6' du cycle benzénique par des groupements méthoxy, entraînant un encombrement stérique autour de la liaison amide (Bryskier, 1999).

Le deuxième type de molécules, se caractérise par la présence en ortho du cycle benzénique d'un pentacycle isoxazole dont la stabilité à l'hydrolyse par les pénicillinases de *S.aureus* est augmentée par la substitution par un groupement méthyle en position 5' (oxacilline). L'introduction d'un atome de chlore en positions 2' et 6' (dicloxacilline) ou d'un atome de chlore et de fluor en position 6' (flucloxacilline) sur le cycle benzénique augmente la stabilité à cette hydrolyse (figure 2) (Bryskier, 1999).

➤ Pénicillines à large spectre

La première des aminopénicillines, l'ampicilline (ou aminobenzylpénicilline), a été obtenue en modifiant la benzylpénicilline par le branchement d'un radical aminé (NH₂) sur sa chaîne latérale en position 6 (Figure 2). Cette modification permet d'élargir le spectre à de nombreux bacilles à Gram négatif non naturellement producteurs de β -lactamases constitutives comme *Escherichia coli* (Essack, 2001).

Les carboxypénicillines (carbénicilline, ticarcilline), ont un groupement carboxyl (COOH) sur la chaîne latérale en position C₆ de l'acide 6-amino-pénicillanique (Figure 2). La présence d'un groupement benzyl différencie la carbénicilline de la ticarcilline qui a un groupement thiényl (Cavallo *et al.*, 2004).

Les acyluréidopénicillines, utilisés par voie parentérale, ont en commun la substitution du groupement urée sur la chaîne latérale en position C₆ de l'acide 6-amino-pénicillanique. Les principales acyluréidopénicillines sont l'azlocilline (groupement imidazolidinone), la mezlocilline (groupement méthyl-sulfonyl-imidazolidone) et la pipéracilline (groupement éthyl-dioxo-pipérazine). La pipéracilline est le produit qui présente les meilleures activités in vitro (Figure 2) (Cavallo *et al.*, 2004).

➤ Amidinopénicillines

Le pivmécillinam, ester oral du mécillinam, est la seule amidinopénicilline actuellement disponible. Les amidinopénicillines diffèrent des autres pénicillines par la présence d'une liaison amide en C₆ sur le noyau pénème. Cette substitution les rend très actives sur certaines entérobactéries (*E. coli*, *Klebsiella*, *Salmonella*) mais peu actives sur l'ensemble des bactéries à Gram positif (Bryskier, 1999 ; Essack, 2001 ; Gazengel, 2001).

➤ Pénicillines sulfones

Les principaux composés de ce sous-groupe sont le sulbactam et le tazobactam. Bien qu'ayant une activité antibactérienne à de fortes concentrations, ce sont surtout des inhibiteurs de β -lactamases de la classe moléculaire A. Ces deux produits sont très proches et présentent une sulfonation en position 1 sur le noyau pénème. Ils diffèrent essentiellement par une substitution de la chaîne latérale en position 2 (Cavallo *et al.*, 2004).

2.1.2. Carbapénèmes

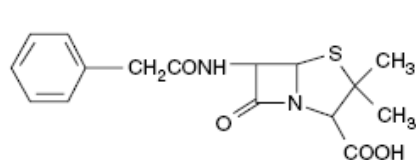
Le représentant est l'imipénème, β -lactamine au spectre le plus large connu et doté d'une grande stabilité vis-à-vis des β -lactamases (Gazengel, 2001).

Ils sont caractérisés par un noyau pénème et dérivent de la thiénamycine, produite naturellement par *Streptomyces cattleya*. L'atome de soufre du pentacycle pénème est remplacé par un atome de carbone pour donner un noyau pénème (figure 1). Cette introduction du carbone dans le noyau pentagonal, à l'origine du terme de carbapénème, renforce le pouvoir de fixation aux protéines cibles. Les carbapénèmes possèdent en position 6 un groupement hydroxyéthyle en position trans à la place des groupes aminoacyl en cis portés par les autres β -lactamines (Demain et Elander, 1999 ; Cavallo *et al.*, 2004).

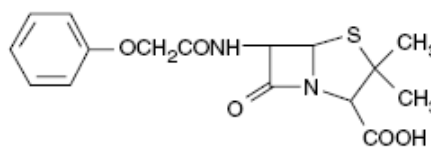
2.1.3. Oxapénames ou clavames

Le noyau clavame (oxapénème) dérive du noyau pénème par substitution du soufre en position 1 par un oxygène. Le seul représentant actuellement utilisé en clinique est l'acide clavulanique (figure 1). L'acide clavulanique a une activité antibactérienne, mais c'est surtout un inhibiteur de différentes β -lactamases de la classe moléculaire A. Ce type de β -lactamine est administré en association avec une autre β -lactamine comme

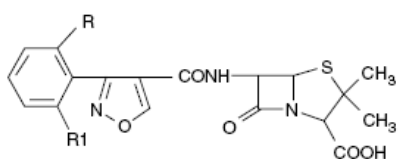
l'amoxicilline ou la ticarcilline, ce qui permet de récupérer, au moins partiellement, leur activité en présence de souches bactériennes productrices de β -lactamases (Moulin et Coquerel, 2002 ; Cavallo *et al.*, 2004).



Pénicilline G



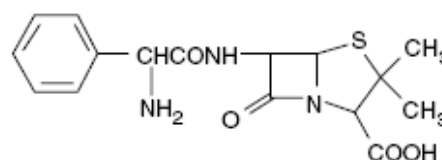
Pénicilline V



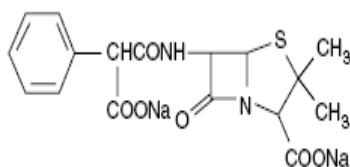
- Oxacilline
- Cloxacilline
- Diclloxacilline
- Flucloxacilline

| | |
|--------|---------|
| R = H | R1 = H |
| R = Cl | R1 = H |
| R = Cl | R1 = C1 |
| R = Cl | R1 = F |

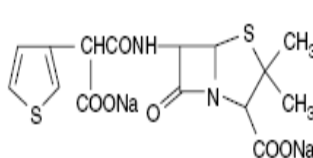
Isoxazolyl pénicillines



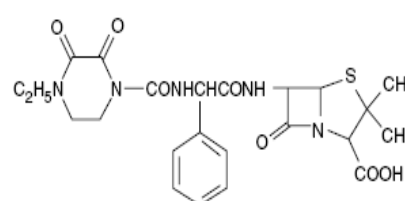
Ampicilline



Carbénicilline



Pipéracilline

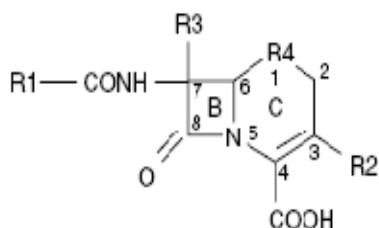


Ticarcilline

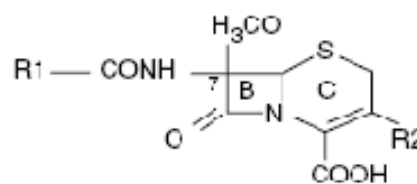
Figure 2: Quelques structures des pénicillines (Bryskier, 1999).

2.2. Dérivés de l'acide 7-amino-céphalosporanique

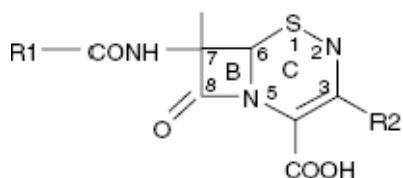
Leur noyau de base associe un cycle β -lactame à un cycle dihydrothiazine pour former l'acide 7-aminocéphalosporanique ou 7-ACA (noyau céphème) et permet de distinguer les céphalosporines des pénicillines. (El-Shaboury *et al.*, 2007). Selon les substitutions en R3 et R4, on distingue les céphalosporines, les céphamycines et les oxacéphèmes (Figure 3) (Cavallo *et al.*, 2004).



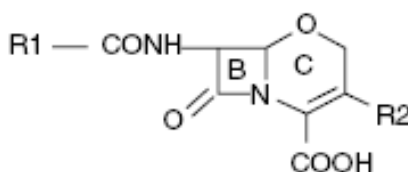
Dérivés de l'acide 7-aminocéphalosporanique
Cycle β -lactame B + cycle dihydrothiazine C
(noyau céphème)



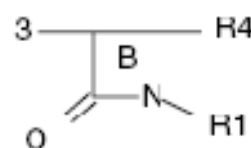
Céphamycines, Radical : méthoxy en C7



Céphalosporines



Oxacéphèmes



Monobactames

Figure 3 : Dérivés de l'acide 7-amino-céphalosporanique et monobactames (Cavallo *et al.*, 2004).

2.2.1. Céphalosporines

Le noyau central céphème associe un cycle β -lactame à un cycle dihydrothiazine (en position 1 on trouve un atome de soufre). Deux types de substitutions sont présentes dans ce groupe (Figure 3) (Cavallo *et al.*, 2004).

2.2.1.1. Substitutions du radical R_1 en position 7

Les substitutions du radical R_1 en position 7 modifient les propriétés antibactériennes et la stabilité de la molécule.

✦ Aminothiazol céphalosporines

La substitution en R_1 par un hétérocycle amino-2-thiazolyl accroît l'activité antibactérienne des céphalosporines vis-à-vis des bacilles à Gram négatif, les principaux représentants sont essentiellement des céphalosporines de troisième génération (Cavallo *et al.*, 2004).

✦ α -pipérazine-dione-céphalosporine.

La présence du radical α -pipérazine-dione en R_1 assure une forte élimination biliaire. Par ailleurs il augmente l'activité contre *P. aeruginosa*, mais confère une activité

moindre aux méthoxyimino-céphalosporines sur les entérobactéries ; ceci est due à une faible résistance aux β -lactamases plasmidiques de type TEM, très fréquentes chez les entérobactéries (Cavallo *et al.*, 2004).

✦ α -sulfo-céphalosporines

Le radical R₁, constitué d'un groupement α -sulfo-phényl, chargé négativement, confère à ces céphalosporines une activité accrue sur *P. aeruginosa* et une faible activité sur les entérobactéries. La cefsulodine est ainsi une céphalosporine anti-*Pseudomonas* à spectre étroit (Cavallo *et al.*, 2004).

✦ α -méthoxy-imino-céphalosporines

La présence d'un radical α -méthoxy-imino en R₁ confère à ces céphalosporines, dont les plus connues sont le céfotaxime et la ceftriaxone, un élargissement du spectre vers les bacilles à Gram négatif et une stabilité plus grande vis-à-vis des β -lactamases que les céphalosporines de première génération (Cavallo *et al.*, 2004).

2.2.1.2. Substitutions du radical R₂ en position 3

Les substitutions du radical R₂ en 3 vont essentiellement modifier les propriétés pharmacocinétiques des céphalosporines tout en renforçant les propriétés antibactériennes, en particulier vis-à-vis de *P. aeruginosa*. Avec le céfotiam par exemple, l'hétérocycle thiotétrazole est substitué par une chaîne diméthyl-amino-éthyl qui lui confère des propriétés cinétiques particulières, notamment une augmentation de la diffusion extravasculaire et un volume apparent de distribution deux à trois fois supérieure aux autres céphalosporines (Cavallo *et al.*, 2004).

Les céphalosporines peuvent être classées, également, selon le temps et leurs propriétés antimicrobiennes en 4 groupes cités ci-après (El-Shaboury *et al.*, 2007).

✦ Céphalosporines de première génération (C1G)

Elles sont actives surtout sur les bactéries à Gram ⁺, essentiellement les streptocoques et les staphylocoques sensibles à la méthicilline. Elles sont également actives sur quelques entérobactéries qui ne produisent pas de céphalosporinases inductibles comme *E. coli*, les salmonelles, *P. mirabilis* ou *Klebsiella spp.* (Moulin et Coquerel, 2002).

Les C1G sont hydrolysées facilement par les β -lactamases acquises. Les principaux produits actuellement disponibles en France sont la céfalotine, la céfazoline et la céfapirine pour les formes parentérales (figure 4), le céfaclor, le céfadroxil et la céfalexine pour les formes orales (Cavallo *et al.*, 2004).

➤ **Céphalosporines de deuxième génération (C2G)**

Leurs propriétés sont très proches de celles des céphalosporines de première génération, elles diffèrent cependant par leur plus grande activité vis-à-vis d'un certain nombre de souches Gram⁻, mais moins actives sur les bactéries Gram⁺. Les représentants de C2G sont la céfoxitine (figure 4) et la céfuroxime.

La céfoxitine est une céphamycine en raison de la présence du méthoxyle en 7 α , la résistance aux β -lactamases repose sur l'encombrement stérique ainsi créé par le carbone 7. Cette particularité structurale s'accompagne, d'une augmentation d'affinité pour les protéines liant la pénicilline (PLP), constituant les cibles moléculaires (Moulin et Coquerel, 2002 ; Gaudy et Buxeraud, 2005).

➤ **Céphalosporines de troisième génération (C3G)**

Cette famille comprend des céphalosporines proprement dites et des céphamycines. Elles se distinguent par un accroissement important de leur spectre antibactérien et par leur stabilité à la plupart des β -lactamases comme les pénicillinases de type TEM ou les céphalosporinases chromosomiques des entérobactéries, de *P. aeruginosa* et *A. baumannii*. Cependant, en cas d'hyperproduction de la céphalosporinase chromosomique ou de production de β -lactamases à spectre élargi ces céphalosporines sont inactivées. Elles sont par ailleurs moins efficaces sur les bactéries Gram⁻ que les céphalosporines de première génération (Moulin et Coquerel, 2002 ; Cavallo *et al.*, 2004).

Les principales molécules disponibles par voie parentérale sont le céfotaxime, la ceftriaxone, la ceftazidime et le ceftizoxime (figure 4). D'autres molécules sont utilisées par voie orale comme le céfixime, le cefpodoxime proxétile ou le céfotiam (Cavallo *et al.*, 2004).

Les dernières céphalosporines injectables de troisième génération commercialisées (céfépime, cefpirome) (figure 4) et appelées par certains «de quatrième génération» présentent un gain d'activité sur les cocci à Gram positif, une activité sur *P. aeruginosa* et

une meilleure résistance à l'hydrolyse par les céphalosporinases hyperproduites (Essack, 2001 ; Cavallo *et al.*, 2004) ;

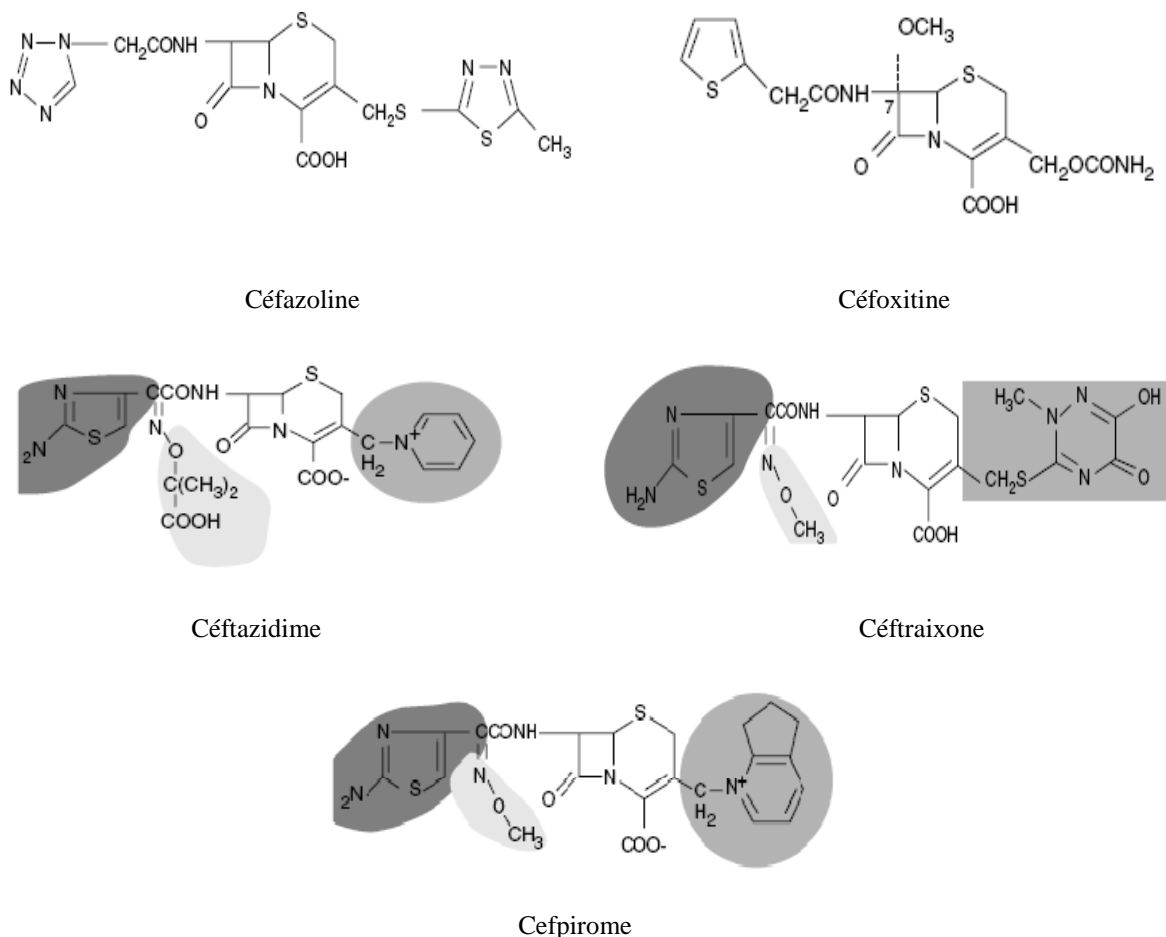


Figure 4: Quelques structures des céphalosporines (El-Shaboury *et al.*, 2007).

2.2.2. Céphamycines

Les céphamycines se caractérisent par la présence d'un groupement 7 α -méthoxy sur le noyau céphème (figure 3). La présence de ce groupement leur confère une meilleure stabilité à l'hydrolyse par les β -lactamases. Les principales molécules sont la céfoxitine et le céfotétan qui sont rattachées, du fait de leurs propriétés, aux céphalosporines de deuxième génération (Bryskier, 1999).

2.2.3. Oxacéphèmes

L'atome de soufre en position 1 du noyau céphème est remplacé par un atome d'oxygène. La présence de ce noyau dihydro-oxazine (oxacéphème) permet une meilleure pénétration à travers la paroi des bacilles à Gram négatif, en raison de la plus grande hydrophilie de la molécule, et une activité inhibitrice de certaines β -lactamases par une analogie de structure avec les clavames (acide clavulanique) (Cavallo *et al.*, 2004 ; Gaudy et Buxeraud, 2005).

2.3. Monobactames

Leur noyau se caractérise par la présence du noyau monocyclique, azétidine, différent du double cycle rencontré chez les pénicillines ou les céphalosporines (Figure 3). Ces composés sont produits par un certain nombre d'espèces bactériennes rencontrées dans le milieu extérieur (eau, sol, végétaux) appartenant à différents genres : *Gluconobacter sp*, *Pseudomonas sp*,... (Bryskier, 1999).

L'aztréonam est le représentant des monobactam. Cet antibiotique a été isolé d'une bactérie (*Chromobacterium violaceum*), et une série de substitutions latérales ont renforcé son efficacité. L'aztréonam est un antibiotique résistant aux β -lactamases et inhibiteur de céphalosporinases. Il est actif sur un nombre élevé d'*Enterobacteriaceae*, de *Pseudomonas* et de la plupart des cocci Gram⁻ (Gazengel, 2001 ; Moulin et Coquerel, 2002).

3. Inhibiteurs des β -lactamases appartenant aux β -lactamines

Afin de prévenir l'hydrolyse des β -lactamines, deux stratégies différentes ont été utilisées. La première utilise la modification de l'antibiotique rendant ainsi l'enzyme incapable de l'hydrolyser tout en gardant son activité antibactérienne, L'autre approche est l'inhibition de l'enzyme en utilisant un produit structurellement similaire au substrat, en combinaison avec un antibiotique (Williams, 1999).

Il existe trois inactivateurs cliniquement utiles : Acide clavulanique, sulbactam et tazobactam qui sont administrés sous forme de combinaisons d'antibiotique / inhibiteur: AugmentinTM (amoxicilline /acide clavulanique), TimentinTM (ticarcilline/ Acide clavulanique), UnasynTM (ampicilline/sulbactam) et ZosynTM (piperacilline / tazobactam) (Buynak, 2005).

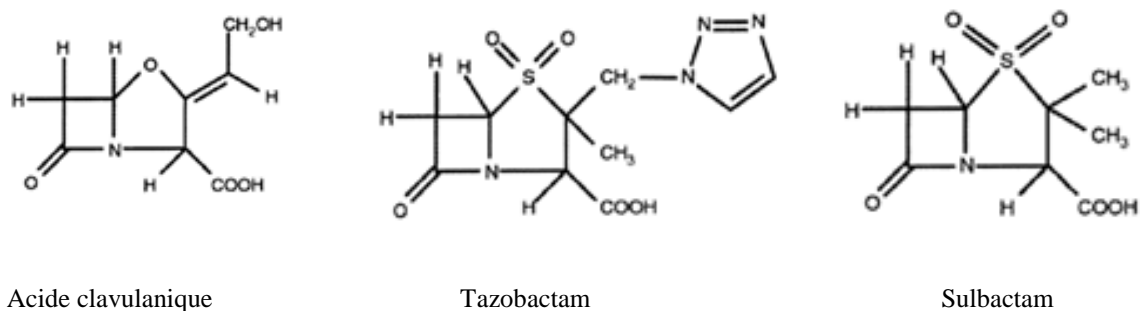


Figure 5 : Structure des inhibiteurs des β -lactamases (Williams, 1999).

Ces inhibiteurs sont structurellement reliés aux pénicillines, possèdent un cycle β -lactame avec une chaîne latérale modifiée, cette structure permet aux inhibiteurs de se lier irréversiblement, comme substrat suicide, aux β -lactamases (Williams, 1999).

- Acide clavulanique

L'acide clavulanique ou le clavulanate a été isolé chez *Streptomyces clavuligerus*. C'est une β -lactamine, qui inactive les β -lactamases d'une grande variété de bactéries Gram⁻ et Gram⁺. L'acide clavulanique ressemble au noyau de pénicilline mais diffère par l'absence d'une chaîne latérale sur C₆. La structure chimique de l'acide clavulanique et de son noyau clavame montre la présence d'un cycle d'oxazolidine, analogue de la structure de base de pénicilline dans lequel un atome d'oxygène remplace l'atome de soufre du noyau péname (Demain et Elander, 1999 ; Liras et Rodriguez- Gracia, 2000).

- Tazobactam

Cet inhibiteur se regroupe dans la même classe que le sulbactam (les pénicillines sulfones), la différence structurale unique étant l'addition d'un groupe de triazole sur le groupe C₂ β -méthyliques. C'est un inhibiteur irréversible de β -lactamase avec une large activité incluant quelques cephalosporinases chromosomiques de *Providencia stuartii* (Essack, 2001 ; Bush *et al.*, 1993). C'est un inhibiteur efficace sur les β -lactamases de la classe A, le tazobactam a également une faible activité sur quelques β -lactamases de la classe C (Buynak, 2006).

- Sulbactam

Il se regroupe dans la classe des pénicillines sulfones, montre une activité particulière sur les enzymes de la classe A en particulier pour SHV-1. Cependant, comparé au clavulanate et au tazobactam, le sulbactam est moins efficace. Sur la classe C de β -lactamases le sulbactam est plus efficace que le clavulanate, considérant que l'activité sur les enzymes de la classe D est moins efficace par rapport aux β -lactamases de la classe A (Akova, 2008).

4. Mode d'action des β -lactamines

Les β -lactamines agissent à l'étape finale de la synthèse de la paroi bactérienne (peptidoglycane), en empêchant la catalyse des réactions de synthèse de peptidoglycane par les carboxypeptidases, transglycosylases et Transpeptidases. Ces enzymes, appelées protéines liant les pénicillines (PLP), sont les cibles des β -lactamines (Essak, 2001; Gaudy et Buxeraud, 2005).

Les β -lactamines présentent une analogie structurale avec un constituant du peptidoglycane en formation, le dipeptide D-ala-D-ala qui est le substrat naturel de ces enzymes. Elles agissent en « substrat suicide » et bloquent le fonctionnement de ces enzymes, en inhibant ainsi la formation du peptidoglycane (Essak, 2001; Gaudy et Buxeraud, 2005).

Les β -lactamines exercent un effet bactériostatique en empêchant les bactéries de se multiplier. Le blocage de la multiplication est suivi d'une lyse bactérienne. Le peptidoglycane est dégradé sous l'action d'autolysines, ce qui entraîne finalement la lyse bactérienne. L'efficacité des β -lactamines tient en partie à cette lyse : c'est la bactéricidie (Essak, 2001; Gaudy et Buxeraud, 2005).

Le nombre et la nature des PLP varient selon les espèces bactériennes. L'affinité des diverses PLP n'est pas la même pour toutes les molécules de β -lactamines. L'effet de β -lactamines est donc fonction de son affinité pour les différentes PLP de la bactérie considérée (Essak, 2001 ; Gaudy et Buxeraud, 2005).

II. β -lactamases

1. Généralités

Les β -lactamases sont des hydrolases, appartenant à la famille d'enzymes EC 3.5.2.6, dont la première enzyme a été identifiée par Abraham et Chaîne en 1940. Ces enzymes catalysent l'hydrolyse irréversible de la liaison amide du cycle β -lactame (ouverture du cycle β -lactame) inactivant ainsi les β -lactamines. Elles représentent le mécanisme le plus utilisé pour la résistance bactérienne aux β -lactamines (Bush, 1989 ; Bonomo *et al.*, 1995 ; Essack, 2001).

Concernant l'origine de ces enzymes, l'idée admise aujourd'hui est que les β -lactamases sont le résultat de conversion de PLP par transformation génétique. Ceci signifie que les deux types de protéines ont évolué à partir d'un ancêtre commun (Massova et Mobashery, 1998; Zeba, 2005).

La différence majeure entre les β -lactamases et les PLP réside dans la vitesse avec laquelle l'acylenzyme se dissocie. En effet, les PLP ne sont capables d'hydrolyser les β -lactames qu'avec une constante $K \approx 0,001 \text{ s}^{-1}$ et l'acylenzyme dans ce cas est très stable ($t_{1/2} > 10 \text{ min}$). Cependant les β -lactamases peuvent hydrolyser les β -lactames avec un $K > 10000 \text{ s}^{-1}$ chez *Bacillus licheniformis* et *Streptomyces albus* dans le cas où le substrat est la benzylpenicilline (Matagne *et al.*, 1998).

Les β -lactamases sont, généralement, extracellulaire chez les bactéries Gram+ ou périplasmiques chez les bactéries Gram-. De rares cas de liaison à la membrane cytoplasmique ont été signalés, chez les mycobactéries, on retrouve une forte proportion d'enzymes dans la couche d'acides mycoliques (Matagne *et al.*, 1998 ; Wilke *et al.*, 2005; Maiti *et al.*, 2006).

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

2. Nomenclature et classification des β -lactamases

2.1. Nomenclature

Les noms des β -lactamases dérivent des substrats préférés (CTX ; céfotaximase) des propriétés biochimiques (SHV; Sulfhydryl reagent variable), des particularités de

séquence (RTG ; Arginine, threonine, glycine), de l'endroit de sa découverte (YOU; Youville Hospital), de la position du gène sur le chromosome (Ybx), de la souche bactérienne (AER ; Aeromonas) , du patient donneur d'échantillon (TEM; Temoneira) et selon les auteurs (PIT; Pitton). Cependant, certaines enzymes sont désignées par le groupe auquel elle n'appartiennent pas (Nmc, qui signifie carbapenemase non métallo-enzyme) et d'autres possèdent plus d'un nom (OXA-23 ou ARI-1, CAZ-1 ou TEM-5) (Heritage *et al.*, 1999; Jacoby, 2006).

2.2. Classification

En raison de la diversité des caractéristiques enzymatiques de nombreuses β -lactamases découvertes jusqu'à présent, plusieurs classifications ont été proposées depuis les années 60 (Bush, 1989 ; Samaha-Kfoury et Araj, 2003). Actuellement, la classification fonctionnelle de Bush *et al.* et la classification structurale d'Ambler sont considérées comme étant les plus pertinentes (Lavigne *et al.*, 2002). Le tableau I donne les classes d'Ambler qui correspondent à chaque groupe de la classification de Bush.

Tableau I : Classes moléculaires correspondant aux groupes fonctionnels (Bush *et al.*, 1995; Livermore, 1998).

| Groupes fonctionnels (Bush <i>et al.</i>) | Classes Structurales (Ambler) | Substrats préférés | | | | | | | Inhibition | | | Enzymes représentatives |
|--------------------------------------------|-------------------------------|--------------------|----------------|------------|---------------|------------|-----------|-----------|-------------|-----------|------|----------------------------------------------------------------------------|
| | | Pénicilline | carbenicilline | Oxacilline | Cephaloridine | Céfotaxime | Aztréonam | Imipénème | Clavulanate | Aztréonam | EDTA | |
| 1 | C | ++ | + | - | +++ | + | - | - | - | ++ | - | AmpC chez les Gram négatif |
| 2a | A | +++ | + | - | ± | - | - | - | ++ | - | - | Pénicillinases des Gram positif |
| 2b | A | +++ | + | + | ++ | - | - | - | ++ | - | - | TEM-1, TEM-2, SHV-1 |
| 2be | A | +++ | + | + | ++ | ++ | -+ | - | ++ | - | - | TEM-3 à TEM-26, SHV-2 à SHV-6 |
| 2br | A | +++ | + | + | + | - | - | - | - | - | - | TEM-30 to TEM-36, TRC- |
| 2c | A | ++ | +++ | + | + | - | - | - | + | - | - | PSE-1, PSE-3, PSE-4 |
| 2d | D | ++ | + | +++ | + | - | - | - | V | - | - | OXA-1 to OXA-11, PSE-2 (OXA-10) |
| 2e | A | ++ | ++ | - | ++ | ++ | -+ | - | ++ | - | - | cephalosporinases inducibles de <i>Proteus vulgaris</i> |
| 2f | A | ++ | + | ? | + | + | -+ | ++ | + | - | - | NMC-A de <i>Enterobacter cloacae</i> , Sme-1 de <i>Serratia marcescens</i> |
| 3 | B | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | - | ++ | - | - | ++ | L1 de <i>Xanthomonas maltophilia</i> , CcrA de <i>Bacteroides fragilis</i> |
| 4 | Non déterminé | ++ | ++ | ++ | V | V | - | - | - | - | - | Penicillinase de <i>Pseudomonas cepacia</i> |

Activité : +++ : substrat préféré ; ++ : bon substrat ; + : hydrolysé - + : hydrolysé à un taux faible ; - : non hydrolysé ; V : varie en fonction de groupe ; ? : Incertain.

Inhibition : +++ : forte inhibition ; ++ : inhibition modérée ; V : inhibition varie en fonction de classe ; - : inhibition négligée.

2.2.1. Classification fonctionnelle (classification de Bush, Jacoby et Medeiros, 1995)

Cette classification a été initialement décrite par Jack et Richmond en 1970, et a été modifiée par Richmond et Sykes en 1973, pour ensuite être révisée à deux reprises par Bush *et al* (1989 et 1995).

La version récente de Bush *et al*, propose de classer les β -lactamases selon leur substrats préférés : pénicilline, oxacilline, carbénicilline, céphaloridine, céphalosporines à large spectre et imipénème et aussi selon son inhibition ou non par l'acide clavulanique et l'EDTA.

Les classifications phénotypiques font face au problème, que les différentes mutations ponctuelles peuvent, considérablement, changer la spécificité du substrat ainsi que leur inhibition (Bush *et al.*, 1995; Livermore, 1995).

Quatre groupes de β -lactamases sont indiqués dans la classification fonctionnelle :

➤ Groupe 1

Il correspond à la classe C d'Ambler, regroupant les céphalosporinases non inhibées par l'acide clavulanique et leurs substrats préférés sont les céphalosporines. Les enzymes de ce groupe sont généralement codées par le chromosome et sont représentées par les AmpC de bactéries Gram négatif tels que P99 de *Enterobacter cloacae*, AmpC de *Pseudomonas aeruginosa* (Bush *et al.*, 1995).

➤ Groupe 2

Ce groupe comporte diverses β -lactamases : Pénicillinases, céphalosporinases, oxacillinases et carbapénèmases, sont des enzymes plasmidiques ou chromosomiques, généralement inhibées par l'acide clavulanique. Ces enzymes sont subdivisés en huit sous-groupes correspondant aux classes moléculaires A ou D (Bush *et al.*, 1995 ; Matagne *et al.*, 1998; Bonomo et Rice, 1999).

Le sous-groupe **2a** contient seulement les pénicillinases inhibées par l'acide clavulanique, cependant le sous-groupe **2b** regroupe les β -lactamases à large spectre (BLSE), qui dégradent les pénicillines et les céphalosporines avec un même taux d'hydrolyse. En outre, de nouveaux sous-groupes ont été isolés de sous groupe **2b** :

Le sous-groupe **2be**, représenté par les BLSE qui sont capables de dégrader les céphalosporines de troisième génération (C3G) : ceftazidime, cefotaxime, et cefpodoxime et les monobactams (aztréonam).

Le sous-groupe **2br**, correspond aux enzymes résistantes à l'acide clavulanique et sulbactam, appelées également enzymes résistantes aux inhibiteurs qui dérivent de TEM, néanmoins, elles sont inhibées par tazobactam.

Le sous-groupe **2c** a été isolé du groupe **2b** de fait que ces enzymes hydrolysent la carbénicilline mieux que la pénicilline G, avec un certain effet sur la cloxacilline. Ces enzymes sont inhibées par l'acide clavulanique.

Les enzymes de sous-groupe **2d** qui correspondent à la classe moléculaire D, hydrolysent la cloxacilline mieux que la pénicilline G avec une faible activité sur la carbénicilline. Ces enzymes sont peu inhibées par l'acide clavulanique. Il est intéressant de noter que beaucoup d'enzymes d'OXA (classe D) hydrolysent la céphaloridine avec une même activité que la pénicilline G couplée à une forte hydrolyse de céphalotine. Les enzymes de ce groupe (PSE ou OXA) sont inhibées par 100 mM de chlorure de sodium. Les enzymes de sous-groupe **2e** sont des céphalosporinases qui peuvent également hydrolyser les monobactams, elles sont inhibées à de faibles concentrations en acide clavulanique.

Le sous-groupe **2f** a été ajouté parce qu'il s'agit de carbapénémases à sérine, contrairement aux carbapénémases appartenant à la classe des métallobactamases incluses dans le groupe 3 (Bush, 1989 ; Ali Shah *et al.*, 2004).

➤ Groupe 3

Leur importance clinique est accentuée par le fait qu'ils hydrolysent les carbapénèmes, ce sont généralement, des métallobactamases à large spectre qui hydrolysent une variété de pénicillines et de céphalosporines. Ce groupe correspond à la classe moléculaire B (Galleni *et al.*, 2001).

Les métallobactamases hydrolysent principalement l'imipénème et non inhibées par les inhibiteurs classiques de β -lactamases. Cependant, elles sont inhibées par l'EDTA et le *p*-chloromercuribenzoate (pCMB). Ces enzymes sont habituellement produites par *Aeromonas hydrophila*, *Bacteroides fragilis* et *Flavobacterium odoratum* (Bush *et al.*, 1995 ; Rasmussen et Bush, 1997).

➤ Groupe 4

Ce groupe inclus les β -lactamases qui ne sont pas caractérisées, ce sont des pénicillinases non inhibées par l'acide clavulanique (Bush *et al.*, 1995).

2.2.2. Classification moléculaire (classification d'Ambler)

La classification d'Ambler est basée sur l'homologie de séquences en acide aminé, en particulier celles du site enzymatique. Elle a été proposée, pour la première fois en 1980, par Ambler où seulement quatre séquences en acides aminés de β -lactamases ont été connues. A cette époque, une classe d'enzymes à sérine (classe A) qui est une pénicillinase PC1 de *S. aureus* et une autre de métallobenzylamido-enzymes (classe B) de *Bacillus cereus* ont été décrites (Ambler, 1980; Palzkill et Botstein, 1992). La classe C de céphalosporinases a été décrite en 1981 par Jaurin et Grunstrom et les enzymes de la classe D regroupant les oxacillinases, isolées des autres classes d'enzymes à sérine à la fin des années 80 (Bush *et al.*, 1995). Selon cette classification, on distingue quatre classes: A, B, C et D.

Les classes d'Ambler A, C et D ont un résidu sérine dans leur site actif, alors que la classe B regroupe les métallobenzylamido- β -lactamases, qui ont besoin d'ions Zn^{++} pour leur activité (Coleman, 2006).

Ces classes peuvent être illustrées par des dendrogrammes basés sur la similitude entre les séquences en acides aminés. Ces dendrogrammes utilisés pour représenter la répartition phylogénique de différentes classes. La figure 6, montre que les β -lactamases à sérine ont une relation structurale avec les DD-peptidases, et la classe C dérive du même ancêtre que les classes D et A (Livermore, 1995; Hall et Barlow, 2003).

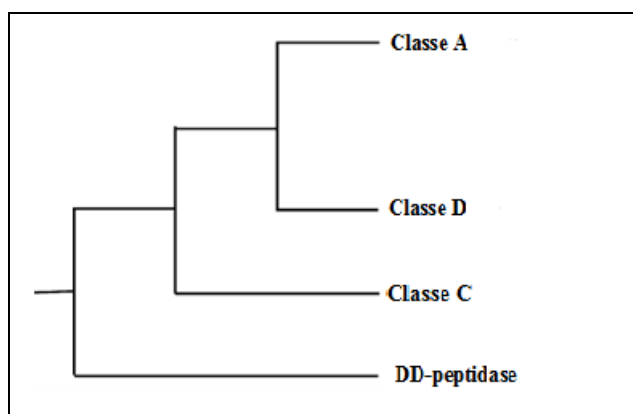


Figure 6 : Dendrogramme de β -lactamases à sérine (Hall et Barlow, 2003).

➤ Classe A

Ces β -lactamases dégradent les pénicillines (péniciline G, amoxicilline, ticarcilline,..) et les céphalosporines (céfasoline, ceftazidime, cefotaxime, cefipime,...), inhibées par l'acide clavulanique. Ces enzymes sont généralement plasmidiques ou portées par les transposons (Bonomo et Rice, 1999). Ce sont les β -lactamases les plus étudiées dont TEM et SHV et leurs dérivées sont les représentants principaux (Matagne *et al.*, 1998 ; Matagne *et al.*, 1999; Zeba, 2005). Plus de 178 séquences pour TEM et 127 séquences pour SHV ont été déterminées (<http://www.lahey.org/Studies/>).

D'autres β -lactamases appartenant à cette classes sont les CTX-M (cefotaximase), qui confèrent une forte résistance au céfotaxime (ou ceftriaxone) au céfépime et à l'aztréonam qu'au ceftazidime, sont des β -lactamases du type BLSE rapportées dans les années 80 (Jacoby et Munoz-Price, 2005; Park *et al.*, 2005).

Les β -lactamases de la classe A ont un poids moléculaire moyen de 29 000 Da et montrent une distribution large des valeurs de pI, varient entre 3,5 et 10,22 de résidus 260-280 (Matagne *et al.*, 1999; Ali Shah *et al.*, 2004).

➤ Classe B

Les β -lactamases de la classe B constituent un groupe restreint en le comparant avec les β -lactamases à sérine. Ce sont des métalloprotéines qui exigent des ions de zn^{++} pour leur activité. La première enzyme (BcII) a été isolée en 1966 à partir de *Bacillus cereus* et pendant les deux décennies suivantes, c'était le seul exemple connu d'une métallo- β -lactamase. Cependant la situation a changé dans les années 80, en effet, des enzymes semblables ont été trouvées chez *Stenotrophomonas maltophilia* (*Xanthomonas maltophilia*), et dans un nombre croissant de souches nosocomiales comme *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae* (Bounaga *et al.*, 1998 ; Philippon *et al.*, 1998; Matagne *et al.*, 1999).

Les métallo- β -lactamase (M β L) sont classées selon l'homologie de séquence dans trois sous-classes : B1(BcII, CcrA), B2 (CphA) et B3(L1) (Dal Peraro *et al.*, 2007). Comporte des β -lactamses chromosomiques et plasmidiques de poids moléculaire entre 25 et 118 kDa avec un pI entre 5,2 et 10,5 (Bush *et al.*, 1995; Walsh *et al.*, 2005).

➤ Classe C

Les enzymes de cette classe sont généralement codées par le chromosome et synthétisées par des bactéries Gram-négatif (Matagne *et al.*,1990). Comparées aux

enzymes diversifiées de la classe A, elles forment une famille plus homogène avec une masse moléculaire moyenne de 39 kDa et d'un *pI* qui varie entre 6,4 et 9,4 (Bush *et al.*, 1995; Matagne *et al.*, 1998; Philippon *et al.*, 2002).

Les β -lactamases de la classe C confèrent une résistance non seulement aux composés classiques tels que l'ampicilline et la céphalotine, mais également aux céphalosporines de troisième génération (C3G) quand la production d'enzymes est à haut niveau (Majiduddin *et al.*, 2002).

➤ Classe D

Comporte les β -lactamases synthétisées par les bactéries Gram négatif avec un poids moléculaire compris entre 27 à 31 kDa. Contrairement à la plupart des enzymes de la classe A et de la classe C, la classe D présente des profils de substrat très différents dont l'oxacilline et la cloxacilline qui sont fortement hydrolysés. A ce effet elles sont considérées comme des oxacillinases (Matagne *et al.*, 1998; Buynak, 2006).

Les enzymes d'OXA sont relativement résistantes à l'inactivation par l'acide clavulanique, mais sont inhibées par NaCl (Babic *et al.*, 2006).

La classe D comporte des oxacillinases de type BLSE, qui dégradent les carbapénèmes et les céphalosporines de 3^{ème} génération. Ces enzymes sont synthétisées par *P. aeruginosa*, et par d'autres bactéries à Gram négatif : *E. coli*, *P. mirabilis*, *Salmonella* sp, *K. pneumoniae* et *Acinetobacter baumannii* (Fisher *et al.*, 2005).

3. Structures et fonction des β -lactamases

Les β -lactamases sont des protéines globulaires possédant des hélices alpha et des feuillets bêtas dans leurs structures (Babic *et al.*, 2006).

3.1. Caractéristiques structurales des β -lactamases à sérine

La structure tridimensionnelle des β -lactamases à sérines est composée de deux domaines. Un domaine est composé d'hélices α (tout α) et un autre domaine α/β composé d'hélices α et de feuillets β (figure 7). Dans ces protéines, trois éléments structuraux conservés contenant des chaînes latérales identiques sont impliqués dans la réaction catalytique (tableau II) :

- L'élément S70XXK73, où la S70 est le résidu sérine essentiel (Ser 64 pour la classe C), situé dans l'extrémité N-terminal de l'hélice α_2 du domaine tout α , il

forme le premier tour de l'hélice α juste après le 1^{er} passage de la charpente de domaine tout α au domaine α/β , il occupe la position centrale dans la cavité du site actif.

- La triade S130DN132 est située sur une boucle courte reliant les hélices α_4 et α_5 de domaine tout α en formant un coté de la cavité. Le premier résidu est hydroxylé, sérine chez la classe A et tyrosine pour les classes C et D. Le deuxième résidu est différent dans les trois classes mais le troisième est toujours Asn.
- Le 3^{em} élément K234S (ou T) GA237 est situé dans le coude β -3 du feuillet β en formant l'autre coté de la cavité du site actif.

Les β -lactamases de la classe A ont un quatrième élément (le motif E166XELN170) situé dans la 2^{ème} boucle (la boucle « Omega ») dans la rangée riche en liaisons hydrogènes dans le site actif. Les acides aminés impliqués sont Glu166 et Asn17. Ces résidus sont essentiels dans le positionnement d'une molécule d'eau conservée (W 1) près du site actif, bien qu'une boucle semblable peut être identifiée chez les β -lactamases de la classe C (Ambler *et al.*, 1991; Lamotte-Brasseur, 1991 ; Frère, 1995).

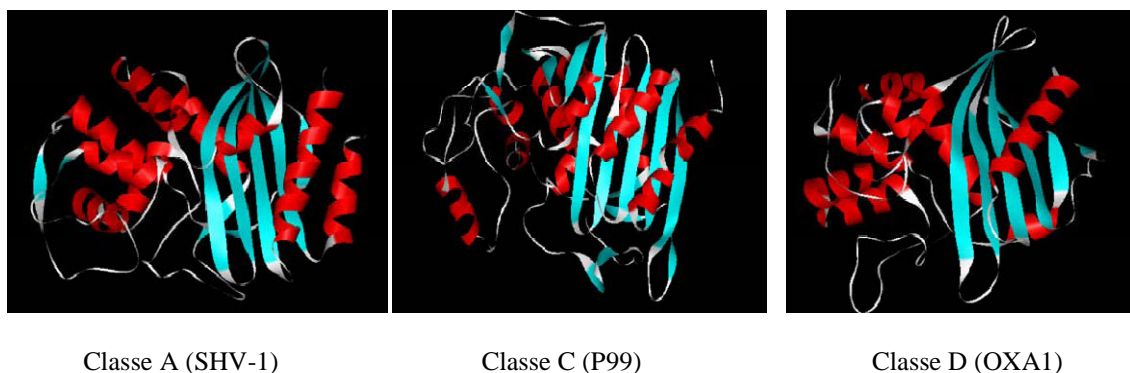


Figure 7: Structure des β -lactamases à sérine (Babic *et al.*, 2006).

Tableau II: Les trois éléments fonctionnels des β -lactamases à sérine (Frère, 1995).

| Classe | Elément 1 | Elément 2 | Elément 3 |
|----------|------------------------|-------------------------------|-------------------------------------------------|
| Classe A | ⁷⁰ S*-X-X-K | ¹³⁰ S-D-N S-D-N | ²³⁴ K-T-G K-S-G R-S-G R-T-G |
| Classe C | ⁶⁴ S*-X-X-K | ¹⁵⁰ Y-A-N | ³¹⁴ K-T-G |
| Classe D | ⁷⁰ S*-X-X-K | ¹⁴⁰ Y-A-N | ²¹⁴ K-T-G |

3.2. Caractéristiques structurales des métallo- β -lactamases (MBL)

Les structures de plusieurs MBL, ont été déterminées par cristallographie à rayon X et elles montrent un pli sous forme « sandwich » de $\alpha\beta / \beta\alpha$, cette structure a été vue pour la première fois chez les MBL (figure 8).

Le site actif de MBL est situé au fond d'un sillon large peu profond entre deux feuillets β et ont deux accepteurs d'ion zinc dans le site actif, souvent désigné sous le nom site 1 et site 2.

Les ligands de zinc dans les deux sites ne sont pas identiques et ne sont pas entièrement conservés entre les différentes MBL, le tableau III montre les résidus d'enzymes impliqués dans la fixation de zinc dans les deux accepteurs dans les sous-classes B1, B2, et B3 (Page et Badarau, 2008).

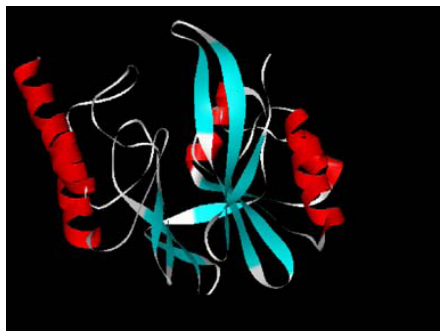
Tableau III : Ligands de zinc chez les métallo β -lactamases (Page et Badarau, 2008).

| Sous-classe | Ligands de 1 ^{er} Zn | | | Ligands de 2 ^{em} Zn | | |
|-------------|-------------------------------|--------|--------|-------------------------------|--------|--------|
| B1 | His116 | His118 | His196 | Asp120 | Cys221 | His263 |
| B2 | Asn116 | His118 | His196 | Asp120 | Cys221 | His263 |
| B3 | His/Gln116 | His118 | His196 | Asp120 | His121 | His263 |

Pour la plupart des substrats, la BCII de *Bacillus cereus* appartenant à la sous classe B1 qui peut fixer un ou deux ions zinc, a une activité catalytique environ deux fois inférieure quand elle fixe un ion par rapport à celle liant deux ions de zinc.

Les Métallo- β -lactamases de la classe B2 sont actives avec un seul ion zinc et la liaison d'un deuxième ion zinc inhibe l'enzyme par une inhibition non compétitive, avec un K_i de 50 μM .

L1, et Fez-1 de la sous-classe B3 sont actives en présence des deux ions zinc (Page et Badarau, 2008). Les enzymes de la classe B n'ont pas de séquence similaire aux β -lactamases à sérine de classes A, C et D (Garau *et al.*, 2004).



Classe B (IMP-1)

Figure 8: Structure des métallob- β -lactamases (Babic *et al.*, 2006).

3.3. Cinétiques et mécanisme d'hydrolyse et d'inhibition des β -lactamases

Les β -lactamases catalysent irréversiblement l'hydrolyse de la liaison amide du cycle β -lactame, le produit est un dérivé acide ayant perdu ses propriétés antibactériennes (Bounaga *et al.*, 1998 ; Bebrone, 2007) (figure 9).

L'activité enzymatique de la plupart des β -lactamases peut être décrite par l'équation de Michaelis-Menten :

$$v = V_{\max} S / (K_m + S) \text{ dont :}$$

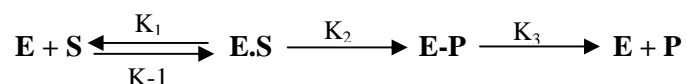
v est la vitesse d'hydrolyse ;

S est la concentration du substrat ;

V_{\max} et K_m sont les constantes catalytiques (Livermore, 1995).

3.3.1. β -lactamases à sérine

Les β -lactamases à sérine hydrolysent les β -lactamines en trois étapes selon la réaction suivante:



La β -lactamase (E), lie le substrat β -lactame (S), en formant un complexe de Michaelis non covalent, (ES). Cette étape est réversible où l'enzyme et le substrat peuvent se dissocier ou s'engager vers la réaction d'hydrolyse, formant l'enzyme acylé via le groupe hydroxyle de la sérine du site actif. Ces intermédiaires sont généralement instables et sont rapidement hydrolysés.

La déacylation du complexe covalent va libérer un produit possédant le cycle β -lactame ouvert (P), et l'enzyme avec son site actif libre (E) complète le mécanisme d'hydrolyse (Bush et Sykes, 1986; Hata *et al.*, 2006).

Ghuysen (1994), a proposé un mécanisme d'hydrolyse détaillé (figure 9), la réaction débute avec l'O γ de la sérine du site actif (Ser70) attaquant le C7 carbonyle du cycle β -lactame. Le groupe OH γ de Ser70 va libérer des protons au N4 adjacent. Cette première étape permet de former le premier intermédiaire tétrahédrique, suivi par l'ouverture du cycle β -lactame pour obtenir une enzyme acylée. Ceci représente l'étape d'acylation.

Dans la deuxième étape l'enzyme acylée adopte une conformation permettant l'extraction d'un proton d'une molécule d'eau. Le groupe OH activé va attaquer le groupe carbonyle C7 de la liaison ester formant le deuxième intermédiaire tétrahédrique. Le proton va être accepté par l'O γ de Ser70, ce qui permet de libérer un composé inactif sur les bactéries. Cette dernière étape est la désacylation (Ghuysen, 1994).

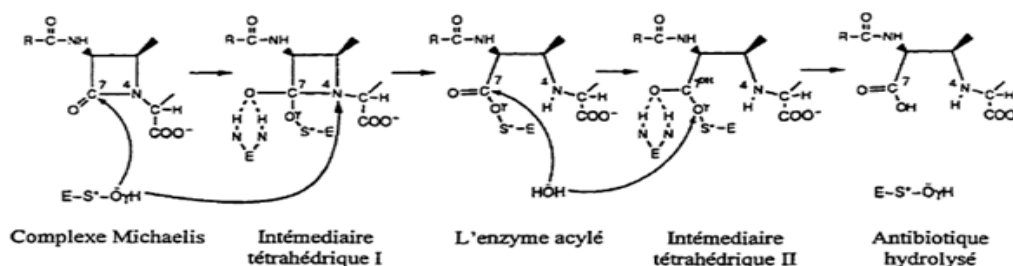


Figure 9 : Mécanisme moléculaire des β -lactamases à sérine (Ghuysen, 1994).

En excluant TEM-7 de *Proteus vulgaris* et les enzymes du type IMI-1, la valeur de K_{cat}/K_m (efficacité catalytique) de la classe A varie de 2800 à 84 000 $\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$ et pour la classe C varie de 1200 à 75 000 $\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$ vers la benzylpénicilline et l'ampicilline, mais les valeurs de k_{cat} des enzymes de la classe C varie de 0,5 à 75 s^{-1} qui sont considérablement inférieures à ceux des enzymes de la classe A (de 130 à 3900 s^{-1}), la différence la plus importante entre ces enzymes est au niveau de l'étape de désacylation (Matagne *et al.*, 1999).

Un examen soigneux des différentes valeurs de k_{cat} et k_{cat}/K_m des classes A et C indique une carence dans la classification de Bush *et al.*, par exemple, les enzymes de *Serratia fontalica* et TEM-71, appartiennent toutes les deux au même groupe 2be, montrent des valeurs nettement différentes des paramètres cinétiques obtenus avec la plupart des antibiotiques testés (Matagne *et al.*, 1999).

3.3.2. Mécanisme des métallo- β -lactamases

Bounaga *et al.* (1998), ont proposé le mécanisme catalytique de l'enzyme BcII, sous sa forme fixant un seul ion du zinc (figure 10). Dans ce mécanisme, l'ion de zinc interagit avec His116, His118, His196 et avec une molécule d'eau, l'ion de zinc se comporte comme acide de Lewis et diminue le pK de la molécule d'eau de sorte qu'elle existe comme ion d'hydroxyde à pH neutre. Cet ion effectue une attaque nucléophile sur le carbone du groupe carboxylique de la β -lactame, mène à la formation d'un intermédiaire tétraédrique stabilisé par son interaction avec l'ion de zinc. Asp120, agit en tant que base, permet d'éliminer les protons de groupe -OH pour produire un deuxième intermédiaire tétraédrique dianionique qui est également stabilisé par l'ion de zinc. Dans une étape suivante, Asp120 donne le proton à l'azote du cycle β -lactame et participe à son ouverture (Bebrone, 2007).

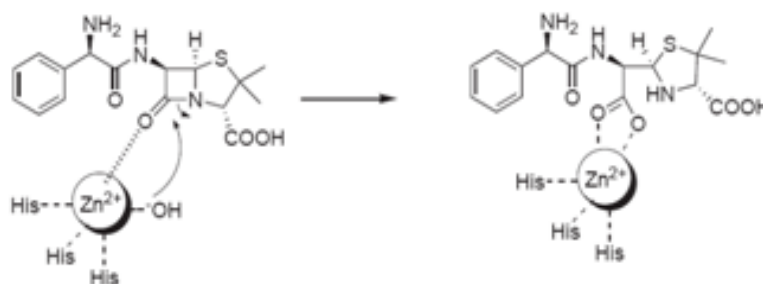


Figure 10: Mécanisme catalytique général des métallo β -lactamases (Wright, 2005).

4. Mécanisme d'inhibition de β -lactamases à sérine

Les inhibiteurs de β -lactamases agissent en tant que β -lactamines en formant un complexe acylé, ils sont identifiés en tant que substrat par les β -lactamases. Cette identification mène à la formation du complexe de Michaelis-Menten, et l'enzyme est acylé. Cette intermédiaire d'acyl-enzyme peut subir trois réactions différentes.

Dans la première réaction, l'inhibiteur va se comporter comme un substrat où l'enzyme catalyse l'hydrolyse par l'ouverture du cycle β -lactame (E+P).

Par contre, dans la deuxième réaction, l'inhibiteur va agir comme un inhibiteur de l'enzyme.

La dernière possibilité est l'interaction de l'enzyme avec l'inhibiteur amenant l'inhibition irréversible de la β -lactamase E-I (Bonomo et Rice, 1999 ; Therrien et Levesque, 2000) .

5. Evolution des β -lactamases

Les β -lactamases chromosomiques, existent dans les bactéries avant l'utilisation d'antibiotiques par l'homme et peuvent avoir un rôle secondaire dans le métabolisme de la paroi de la cellule bactérienne, ou peuvent se protéger contre des β -lactames produits par les mycètes présents dans l'environnement. L'utilisation des β -lactames a favorisé chez les bactéries la production de grandes quantités de β -lactamases chromosomiques, plasmidiques ainsi que des mutants de β -lactamases avec un spectre élargi (Livermore, 1998).

Depuis les années 80, avec la commercialisation des céphalosporines de troisième génération (C3G), de l'aztréonam et des carbapénèmes, nous avons assisté à une explosion ou émergence de nouvelles enzymes, chez les bacilles à Gram négatifs cliniquement importants, Entérobactéries, *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii*, capables de conférer la résistance à ces nouvelles molécules (Arlet et Philippon, 2003).

Les événements génétiques identifiés sont de deux ordres :

- Evolution d'enzymes « anciennes » telles que TEM, SHV, OXA par mutation ;
- Apparition de « nouveaux » gènes transférables au sein d'éléments génétiques particuliers comme les intégrons. Certains d'entre eux dérivent de gènes chromosomiques, alors que la parenté de certaines autres n'est pas connue (Arlet et Philippon, 2003).

Il n'y a pas de consensus concernant la définition de β -lactamases à spectre élargi ou BLSE. Classiquement, les BLSE sont définies comme des enzymes appartenant à la classe A ou D de la classification d'Ambler, capables d'hydrolyser les pénicillines, les céphalosporines C1G, C2G, C3G et C4G et l'aztréonam. Elles hydrolysent la ceftazidime, le céfotaxime ou l'aztréonam au moins 10 % plus activement que la pénicilline. Elles n'hydrolysent pas les carbapénèmes et sont inhibées *in vitro* par les inhibiteurs des β -lactamases (acide clavulanique, tazobactam et sulbactam) (Rodriguez-Villalobos et Struelens, 2006).

➔ Type TEM

La majorité des BLSE de ce type dérivent par quatre à sept mutations ponctuelles de l'enzyme originale (TEM-1 ou TEM-2). Ces mutations rendent l'enzyme capable d'hydrolyser les C3G, mais aussi plus sensible à l'action des inhibiteurs (acide clavulanique). Cependant, d'autres mutations peuvent conférer la résistance aux

inhibiteurs. Ces variantes sont appelées TRI (TEM résistantes aux inhibiteurs) (Rodriguez-Villalobos et Struelens, 2006).

Ces mutations ont un effet sur le plan structural, dont les changements sur le résidu 164 (Arg), sont les plus observés chez les TEM, un autre acide aminé donnant des liaisons hydrogènes soit par une sérine ou une histidine, TEM-5-TEM-12, apparaît, ce qui engendre une diminution du nombre de liaisons hydrogènes ou une élimination des attractions électrostatiques dans la boucle « Oméga »; Ce changement laisse plus de flexibilité dans la boucle, ce qui ouvre alternativement plus d'espace pour les substitutions encombrantes de β -lactame. Le mutant de R164S TEM-1 préparé par la mutagenèse, a montré une amélioration de l'efficacité catalytique pour le céfotaxime, le ceftazidime et l'aztréonam (Knox, 1995).

➤ Type SHV

Après TEM, le type SHV constitue celui comportant le plus grand nombre d'enzymes BLSE. Comme dans le cas des enzymes de type TEM, les enzymes de ce type dérivent par mutations ponctuelles de l'enzyme originale SHV-1. L'origine de ces enzymes est probablement une variante de l'enzyme chromosomique K2 de *K. pneumoniae* (Jacoby et Medeiros, 1991 et Rodriguez-Villalobos et Struelens, 2006).

Elles peuvent faire varier leur spectre d'activité suite à diverses mutations ponctuelles. La mutation Arg(203)Leu et Glu(237)Lys chez SHV-5 assurent une résistance élevée à la ceftazidime.

➤ Type CTX

Les BLSE du type CTX-M ont été décrites initialement en 1986 (FEC-1) au Japon, Allemagne et France en 1989 (CTX-M-1), puis sont disséminées largement dans le monde (Rodriguez-Villalobos et Struelens, 2006).

À la différence des types précédents, les CTX-M confèrent une résistance marquée au céfotaxime (origine de son nom) et au céfépime. En revanche, l'inactivation de la ceftazidime est plus limitée, à l'exception d'enzymes récemment décrites (CTX-M-15, CTXM-16, CTX-M-27) qui ont une forte capacité hydrolytique pour la ceftazidime. Les CTX-M sont plus fortement inhibées par le tazobactam que par l'acide clavulanique. Comme les β -lactamases de types SHV et TEM les mutations ponctuelles peuvent influencer l'activité de ces enzymes. Par exemple la substitution Asp (240) Gly, de CTX-M-27 diminue l'efficacité hydrolytique du cefotaxime mais elle est améliorée pour le

ceftazidime comparée avec celle de CTX-M-14 (Rodriguez-Villalobos et Struelens, 2006 ; Chen *et al.*, 2005).

✦ **Type OXA**

Les BLSE de type OXA diffèrent des enzymes de TEM et de SHV du fait qu'ils appartiennent à la classe moléculaire D. Plusieurs BLSE du type OXA sont dérivées d'OXA-10 (OXA-11, -14, -16, et -17) (Bradford, 2001).

Parmi les enzymes dérivées d'OXA-10, les variantes de BLSE ont une ou deux substitutions d'acides aminés : Ser (73)Asp ou Gly(157)Asp. La substitution de Gly157 par Asp peut être nécessaire pour la résistance à un niveau élevé au ceftazidime. En plus du groupe OXA-10, OXA-15 est un dérivé d'OXA-2, et Oxa-18 n'est pas directement dérivé d'un seul type d'OXA (OXA-9 ou OXA-12), avec une homologie de 42% avec l'OXA-9 (Bradford, 2001).

Chapitre II

Matériel et méthodes

1. Souche bactérienne

Cette étude a été réalisée sur une souche de *Acinetobacter baumannii* 607 : Cette souche a été isolée en 2007 au niveau du laboratoire de bactériologie médicale du CHU Mohamed Nedir de Tizi Ouzou.

2. Milieux et réactifs

Les milieux utilisés sont :

- Le bouillon nutritif et la gélose nutritive pour l'entretien et la culture de la souche ;
- Muller Hinton pour les antibiogrammes et le test de synergie ;
- Tous ces milieux proviennent de l'Institut Pasteur d'Algérie et leur composition est donnée en annexe V.

2.1. Antibiotiques

Les antibiotiques (disques) utilisés pour l'antibiogramme et le test de synergie sont : céfotaxime (CTX), ceftazidime (CAZ), céfépime (FEP), cefpirome (CPO), aztréonam (ATM) qui ont une charge de 30 µg, imipénème (IPM) à 10µg et ticarcilline / acide clavulanique (TCC 75/10µg).

Les antibiotiques utilisés, comme substrat ou inhibiteur sont sous forme de poudre sodique pour des solutions injectables (tableau IV).

Tableau IV: Antibiotiques utilisés pour l'étude cinétique.

| Antibiotiques | Origine |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| Céfazoline (CEZ) | LDP laboratoire torlan Espagne |
| Amoxicilline (AMX), pénicilline G (PEN), céfotaxime (CTX) et cefoxitine (FOX) et Piperacilline (PIP), Oxacilline (OXA) | Panapharma France |
| Cefiprome (CFP) | Aventis |
| Ceftazidime (CAZ), ticarcilline (TIC) et ticarcilline + acide clavulanique (TCC) (5000g/0,2g) | GlaxoSmithkline |
| Ceftriaxone (CRO) | Winthrop |
| Cloxacilline (CLOX) | Orbinine |
| Aztréonam (ATM) | Sanofi-aventis France |
| Pepiracilline + tazobactam (TZP) (4g/0,5g) | Laboratorio Pharmaceutico Italie |

2.2. Produits d'électrophorèse , de test de détection et de zymogramme

Acrylamide et Bis Acrylamide , TEMED et Tris base proviennent de Fluka , glycine de Prolabo, Persulfate d'ammonium trichloroacétique de Biochem Chemopharma, SDS , bleu de bromophenol, bleu de comassie, méthanol, acide acétique glacial, iode , iodure de potassium, amidon et agar (Sigma).

Les protéines standards utilisées sont : BSA(63 kDa), ovalbumine (43 kDa), carbonique anhydrase (29 kDa) et ribonucléase (13,7 kDa) proviennent de Sigma.

3. Sensibilité aux antibiotiques et test de synergie

La sensibilité aux antibiotiques est déterminée par la méthode des disques sur gélose Mueller Hinton selon les recommandations du Comité Français de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (communiqué du CFA-SFM, 2007).

Le test de synergie est utilisé pour la détection des BLSE selon la méthode de Jarlier et *al.*(1988). Ce test consiste à déposer autour d'un disque d'amoxicilline /acide clavulanique ou de ticarcilline/acide clavulanique sous forme de croix des disques de céfotaxime, ceftazidime, ceftriaxone et aztréonam sur la gélose Muller- Hinton, la distance entre les disques est comprise entre 15 et 30mm, la présence d'une BLSE se traduit par l'apparition d'une synergie entre les disques de oxymino- β -lactamine et le disque contenant ticarcilline et acide clavulanique .

4. Culture bactérienne et extraction de β -lactamases

4.1. Culture bactérienne

La souche d'*Acinetobacter baumannii*, conservée dans un tube ensemencé par piqure centrale est repiquée sur une boîte de Pétri contenant la gélose nutritive puis incubée à 37°C pendant 24 h . A partir de cette dernière, on prélève quelques colonies et on ensemence 100 ml du bouillon nutritif dans des flacons de 500ml. L'oxacilline est ajoutée à cette culture à une concentration de 2,45 mM, puis incubée à 37°C pendant une nuit sous agitation (Reading et Cole, 1977 ; Simpson et *al.*,1980).

Après incubation, la culture est centrifugée à 4500g pendant 30 min, et les cellules récupérées sont lavées deux fois avec le tampon phosphate (Na_2HPO_4 , KH_2PO_4) à 25 mM et le culot bactérien est conservé à 0°C.

4.2. Extraction de β -lactamases

Les β -lactamases des espèces à Gram négatif sont en grande partie periplasmiques et nécessitent pour être libérées la rupture de la paroi (Livermore, 1995).

Les cellules d'*Acinetobacter baumannii* sont lysées par sonication. Le Protocole utilisé est celui préconisé par Simpson *et al.* (1980); Ben achour *et al.* (2007).

Les cellules sont récupérées dans des tubes à hémolyse à raison de 2ml (2% du volume original) dans du tampon phosphate (Na_2HPO_4 , KH_2PO_4) à 25mM, pH 7) puis déposés dans un bain de glace pour y subir une lyse à l'aide d'un sonicateur type Sonics Vibra cell avec une puissance de 130Watt et une fréquence de 20Khz. Chaque tube subit 3 cycles de sonication de 5 minutes avec un repos de 10 minutes entre chaque cycle.

Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 20000 g pendant 30 minutes à 4°C avec une centrifugeuse du type Sigma et le surnageant est récupéré comme extrait enzymatique puis conservé à 0°C (Poirel *et al.*, 1999).

5. Dosage des protéines

Le dosage des protéines est effectué sur l'extrait enzymatique préparé ci dessus selon la méthode de Lowry *et al.*, (1951), qui ont combiné une réaction au biuret et une réaction au réactif de Folin-Ciocalteu. Ce dernier, à base de phosphomolybdate et de phosphotungstate, réagit avec les tyrosines et les tryptophanes, pour donner une coloration bleue qui s'ajoute à celle du biuret.

La méthode est réalisée comme suit :

- Des solutions de l'albumine du sérum bovin (BSA) sont préparées avec des concentrations de 0, 25, 50, 75, 100, 150 et 200 $\mu\text{g/ml}$;
- 0,5ml de la solution (D) sont ajoutés pour chaque tube, puis 2,5ml de la solution (C) ;

- Les mélanges sont laissés au repos pendant 10 minutes ;
- 0,5ml de la solution (E) sont ajoutés pour chaque tube ;
- Après l'incubation à l'obscurité pendant 30 minutes, la densité optique des mélanges est mesurée à 750 nm.

La concentration en protéines est déterminée à partir de l'équation de régression linéaire de la gamme d'étalonnage (0-200 μ g/ml)

La composition des différentes solutions et la gamme des dilutions utilisées sont données en annexes II.

6. Test de détection sur gel d'iode

1,5g d'agar et 0,5g d'amidon sont mélangés à 100ml de tampon phosphate (Na_2HPO_4 , KH_2PO_4) à une concentration de 50 mM, pH 7; ce mélange est porté à ébullition trois fois à intervalle de 10 minutes entre chaque ébullition.

Après refroidissement, on ajoute successivement :

- 1,5ml de la solution d'iode-iodure de potassium (2g/53g dans 100ml) ;
- 1ml de la céfazoline ou de la pénicilline G à des concentrations successives de 2,26 mM et 2,81mM .

Puis la solution est versée immédiatement dans des boîtes de Pétri.

Pour la détection de l'activité, des puits de 6 mm sont formés dans la gélose et 10 μ l de l'extrait brut y sont déposés en utilisant un témoin négatif qui est le tampon phosphate.

7. Etude de la cinétique enzymatique des β -lactamases

7.1. Mesure de l'activité enzymatique

L'activité enzymatique de l'extrait est déterminée en mesurant la diminution de la densité optique en fonction du temps, selon le protocole de Fukagawa *et al.* (1980) en utilisant un spectrophotomètre (Shimadzo).

40 μ l ou 60 μ l de l'extrait enzymatique sont ajoutés à une solution de différents antibiotiques à différentes concentrations préparées dans un tampon phosphate à 25 mM, pH 7 (Ben achour *et al.*, 2007), pour avoir un volume réactionnel final de 15 ml pour la cefazoline et 12 ml pour les autres antibiotiques. La concentration de l'extrait dans le volume réactionnel final est de 3,066 μ g/ml, l'activité est mesurée à 30°C (Fujii *et al.*, 1986).

La densité optique est mesurée à différentes longueurs d'onde et les coefficients d'extinction molaire utilisés sont donnés dans le tableau V.

Tableau V: Longueurs d'onde et coefficients d'extinction molaire des antibiotiques testés (Minami *et al.*, 1980 ; Laraki *et al.*, 1999).

| Antibiotiques | Longueurs d'onde (nm) | Coefficient d'extinction molaire $\Delta\varepsilon$ ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$) | Gamme de concentration (μ M) |
|---------------|-----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|
| Pénicilline G | 235 | - 775 | 100-1000 μ M |
| Ticarcilline | 235 | - 660 | 10-400 μ M |
| Pipiracilline | 235 | - 820 | 10-200 μ M |
| Oxacilline | 260 | Non utilisé | 80-500 μ M |
| Amoxicilline | 235 | Non utilisé | 10-400 μ M |
| Aztréoname | 320 | Non utilisé | 20-500 μ M |
| Céfazoline | 263 | + 771 | 10-100 μ M |
| Céfotaxime | 260 | Non utilisé | 10-100 μ M |
| Ceftazidime | 260 | Non utilisé | 10-100 μ M |
| Ceftriaxone | 260 | Non utilisé | 10-100 μ M |
| Cefoxitine | 260 | Non utilisé | 10-300 μ M |
| Cefpirome | 260 | Non utilisé | 10-200 μ M |

L'analyse de la variance avec le test LSD (du logiciel Satatistica 5.0) est réalisée afin de comparer les différents résultats obtenus pour l'hydrolyse de l'antibiotique.

7.2. Etude du profil d'inhibition

Les tests d'inhibition sont réalisés en présence de concentrations différentes des inhibiteurs suivants : Cloxacilline, aztréonam, NaCl et EDTA.

Par ailleurs, le Tazobactam et l'acide clavulanique ont été testés sous forme de mélange : piperacilline/ tazobactam et ticarcilline /acide clavulanique

Les concentrations testées de la tazobactam sont : 1,6 μM , 3 μM , 6,5 μM , 10 μM , 13 μM , 16 μM , 32 μM .

Les concentrations testées de l'acide clavulanique sont : $2 \cdot 10^{-3} \mu\text{M}$, $1,5 \cdot 10^{-3} \mu\text{M}$, $10^{-3} \mu\text{M}$, $5 \cdot 10^{-4} \mu\text{M}$, $2,5 \cdot 10^{-4} \mu\text{M}$).

L'extrait à une concentration de 3,066 $\mu\text{g/ml}$ est incubé avec les inhibiteurs pendant 10 min à 30°C (Bush *et al.*, 1993).

Pour initier la réaction, différents volumes en antibiotiques sont ajoutés pour avoir la concentration en antibiotique voulue, puis la diminution de l'absorbance est suivie à différentes longueur d'ondes (tableau V).

8. Electrophorèse non dénaturante sur gel polyacrylamide et zymogramme

Dans le but de déterminer le poids moléculaire et le nombre d'enzymes produites par la souche étudiée une électrophorèse non dénaturante est effectuée selon la méthode Walker, (2002). La localisation des β -lactamases est réalisée par la technique iodométrique Eftekhari et Rafice, (2006), décrite ci après :

Produits utilisés leur préparation sont donnés en annexe III.

L'échantillon doit être dilué pour avoir une concentration de tampon 1X.

• Gel de séparation à 7,5%

- ✓ Mélanger 1,875 ml de la solution stock acrylamide avec 1,875 ml de tampon à 1,5M de tris à pH 8,8 ;
- ✓ 3,712 ml de d'eau distillée puis 37,5 μl de Persulfate d'ammonium à 10% sont ajoutés;
- ✓ Après un dégazage pendant environ 30 s, 3,75 μl de TEMED sont ajoutés.

La solution préparée est versée à l'aide d'une pipette pasteur dans les plaques d'électrophorèse à environ 2 cm de l'extrémité en évitant la formation des bulles d'air, puis attendre environ 20 min ou plus pour que le gel se solidifie.

Pour éviter les rides sur la surface du gel on ajoute délicatement une petite quantité d'eau distillée après avoir versé le gel.

- **Gel de concentration à 5%**

- ✓ Après avoir préparé le gel de séparation le gel de concentration est préparé comme suit :

- 0,5 ml de la solution stock acrylamide sont mélangés avec 1ml du tampon tris HCl à 0,5 M, pH 6,8 et 2,466 ml d'eau distillée ;
- Ajout de 33,33 μ l de Persulfate d'ammonium à 10% ;
- Dégazage de la solution pendant 30 s, puis 5 μ l de TEMED sont ajoutées la solution préparée est versée après avoir effectuée deux lavages avec de l'eau distillée et les traces de l'eau restante doivent être séchées avec du papier filtre ;
- L'échantillon et les standards sont déposés dans les puits à un volume de 20 μ l. Le générateur est réglé à une fréquence de 25 mA et une différence de potentielle de 100 V.

Après la récupération du gel d'électrophorèse native, on coupe le gel en trois parties :

La première partie est utilisée pour la coloration classique, la deuxième et la troisième sont déposées sur des plaques en verres, puis recouvertes par le gel d'amidon préparé préalablement et dans ce cas les antibiotiques utilisés sont la céfazoline et pénicilline G. Après un temps d'incubation des zones transparentes correspondant aux β -lactamases apparaissent sur le gel d'iode.

Chapitre III
Résultats et discussion

1. Sensibilité de la souche et DD-test

- Antibiogramme

Les résultats de l'antibiogramme montrent que la souche d'*Acinetobacter baumannii* résiste à toutes les β -lactamines testées (céfotaxime, céftazidime, cefpirome et céfépime) à l'exception de l'imipénème (tableau VI).

Tableau V : Antibiogramme de la souche d'*Acinetobacter baumannii*.

| | CTX | CAZ | FEP | CPO | IMP |
|---------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| Diamètre (mm) | 0 | 9 | 12 | 10 | 31 |
| Sensibilité | R | R | R | R | S |

R : Résistante, S : Sensible

- DD-test

La figure 11, montre l'absence d'image de synergie entre les β -lactamines (CAZ, ATM et CTX) et le disque de ticarcilline/acide clavulanique. ce qui se traduit par l'absence de BLSE chez la souche d'*Acinetobacter baumannii* étudiée.

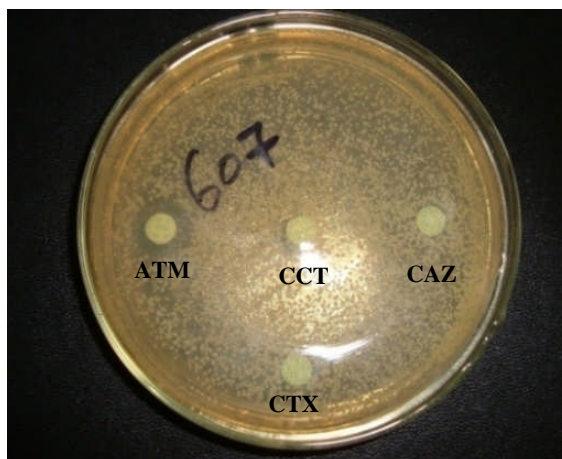


Figure 11: Test de synergie de la souche d'*Acinetobacter baumannii*.

2. Dosage des protéines

La teneur en protéine de l'extrait enzymatique préparé est de 920 μ g/ml (courbe d'étalonnage en annexe IV).

3. Test de détection de β -lactamases sur le gel d'iode

Le test de détection sur le gel d'iode est réalisé dans le but de démontrer si la souche d'*Acinetobacter baumannii* produit ou non des β -lactamases. Les résultats obtenus (figure 12) montrent l'apparition de zones transparentes autour des puits environ 10 min après le dépôt de l'extrait enzymatique pour les deux gels préparés avec la pénicilline G et la céfazoline. la réduction du complexe iode-amidon par l'acide penicilloïque issu de l'hydrolyse de la pénicilline par la β -lactamase, ce qui entraîne une décoloration du gel de couleur violette (Livermore et Derek, 2001).

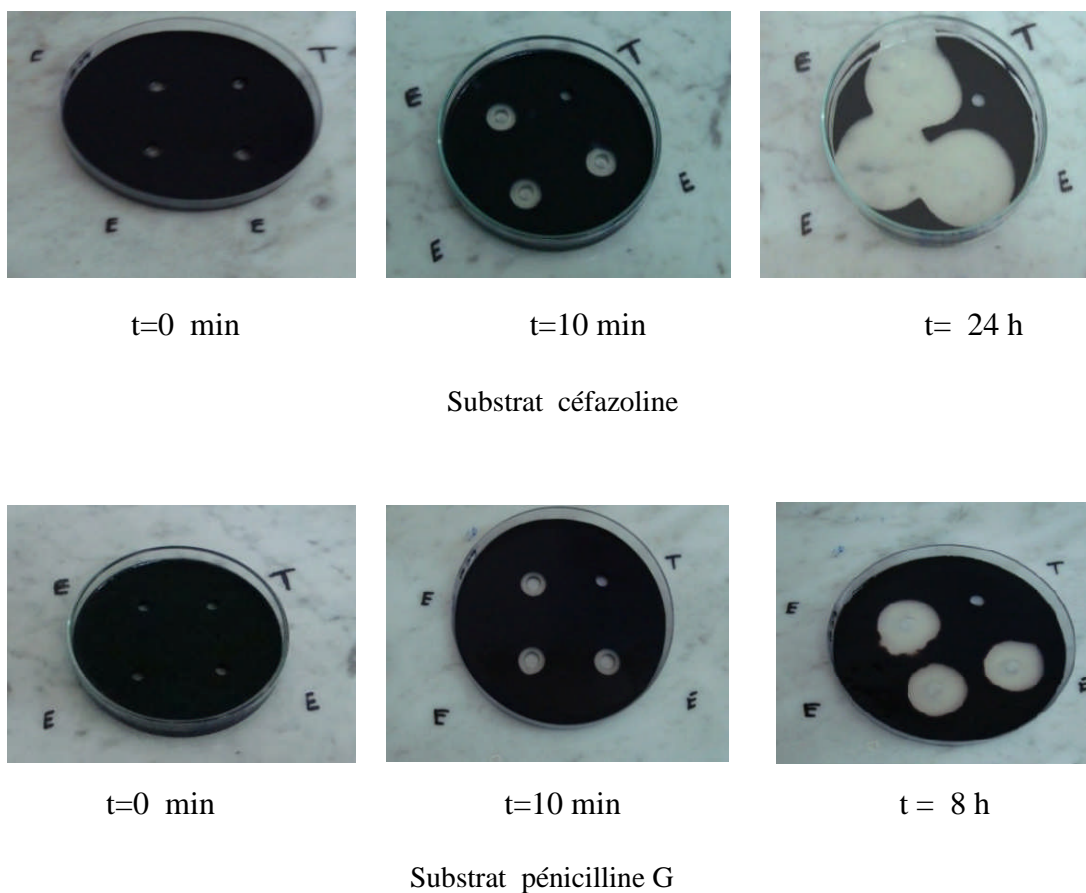


Figure 12: Test de détection sur gel d'iode.

4. Profils du substrat et d'inhibition

4.1. Profil du substrat

L'évolution de l'absorbance de l'extrait enzymatique / β -lactamines en fonction du temps, est représentée sous forme de courbes dans les figures 13 et 14.

La diminution de l'absorbance en fonction du temps, indique que l'antibiotique testé est dégradé par les enzymes produites par la souche étudiée.

4.1.1. Pénicilline G, ticarcilline, céfazoline et pipéracilline

A partir des résultats illustrés dans la figure 13, la pénicilline G, la ticarcilline, la pipéracilline et la céfazoline sont hydrolysées par les enzymes présentes dans l'extrait enzymatique préparé.

Les taux d'hydrolyse sont exprimés sous forme de pourcentage par rapport à la pénicilline G à des concentrations de 100 ou 200 μ M (tableau VII). Les vitesses d'hydrolyse sont données dans les tableaux (annexe V). On note ainsi que la céfazoline est hydrolysée à un taux très important par rapport à la pénicilline G, indiquant que l'extrait enzymatique contient une céphalosporinase.

Tableau VII : Taux d'hydrolyse de TIC, PIP et CEZ par rapport à PNG.

| Substrat | Taux d'hydrolyse (%) |
|---------------|----------------------|
| Céfazoline | 1309,9 |
| Pipéracilline | 19,4 |
| Ticarcilline | 63,3 |

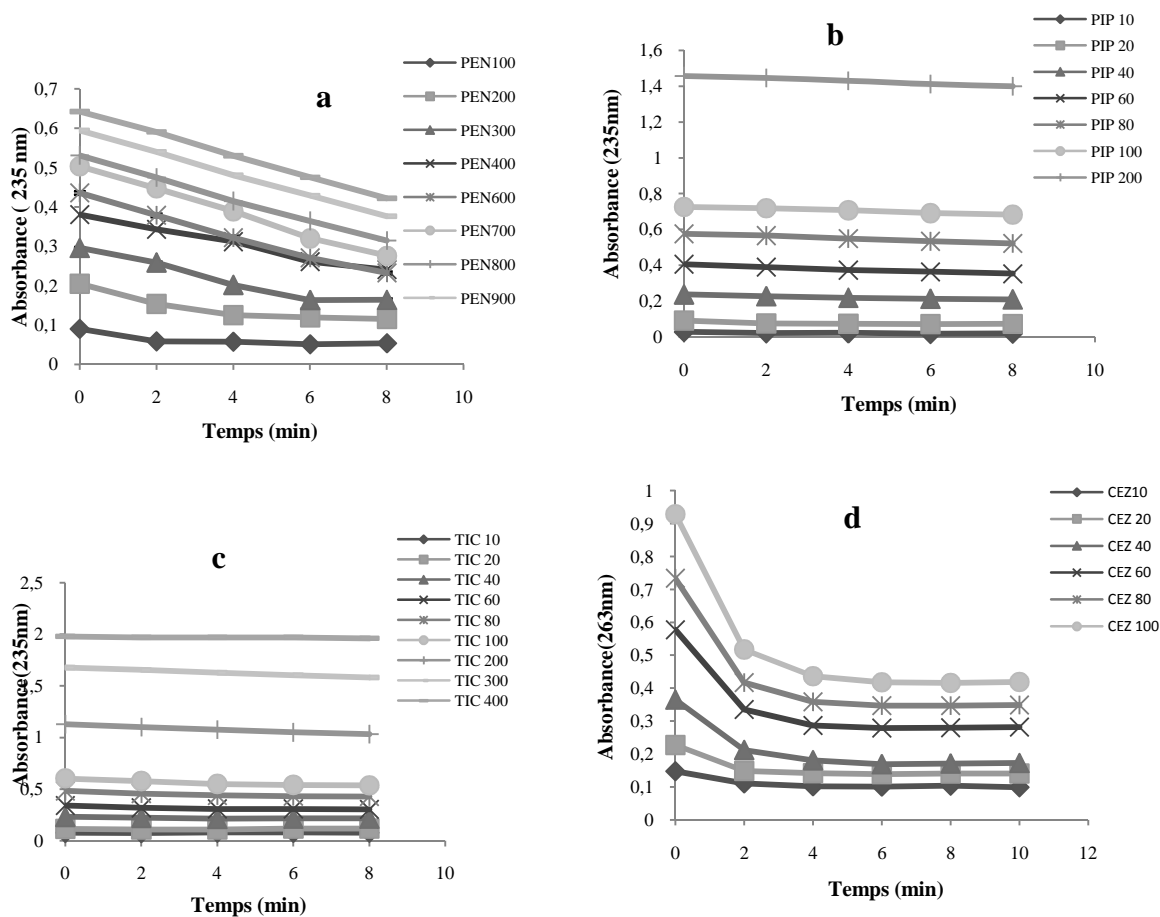


Figure 13: Variation de l'absorbance en fonction du temps à différentes concentration en μM (a : PEN , b : PIP , c : TIC et d : CEZ).

4.1.2. Ceftazidime, céfotaxime, cefpirome, ceftriaxone et céfoxitine, Aztréonam, Amoxicilline et Oxacilline

La figure 14 montre que les β -lactamines : Ceftazidime, céfotaxime, cefpirome, ceftriaxone, céfoxitine, aztréonam, amoxicilline et oxacilline ne sont pas hydrolysés par l'extrait enzymatique. *Acinetobacter baumannii* produit une céphalosporinase naturelle qui n'hydrolyse pas les céphalosporines à spectre élargi (Bou et Martinez-Bletran, 2000).

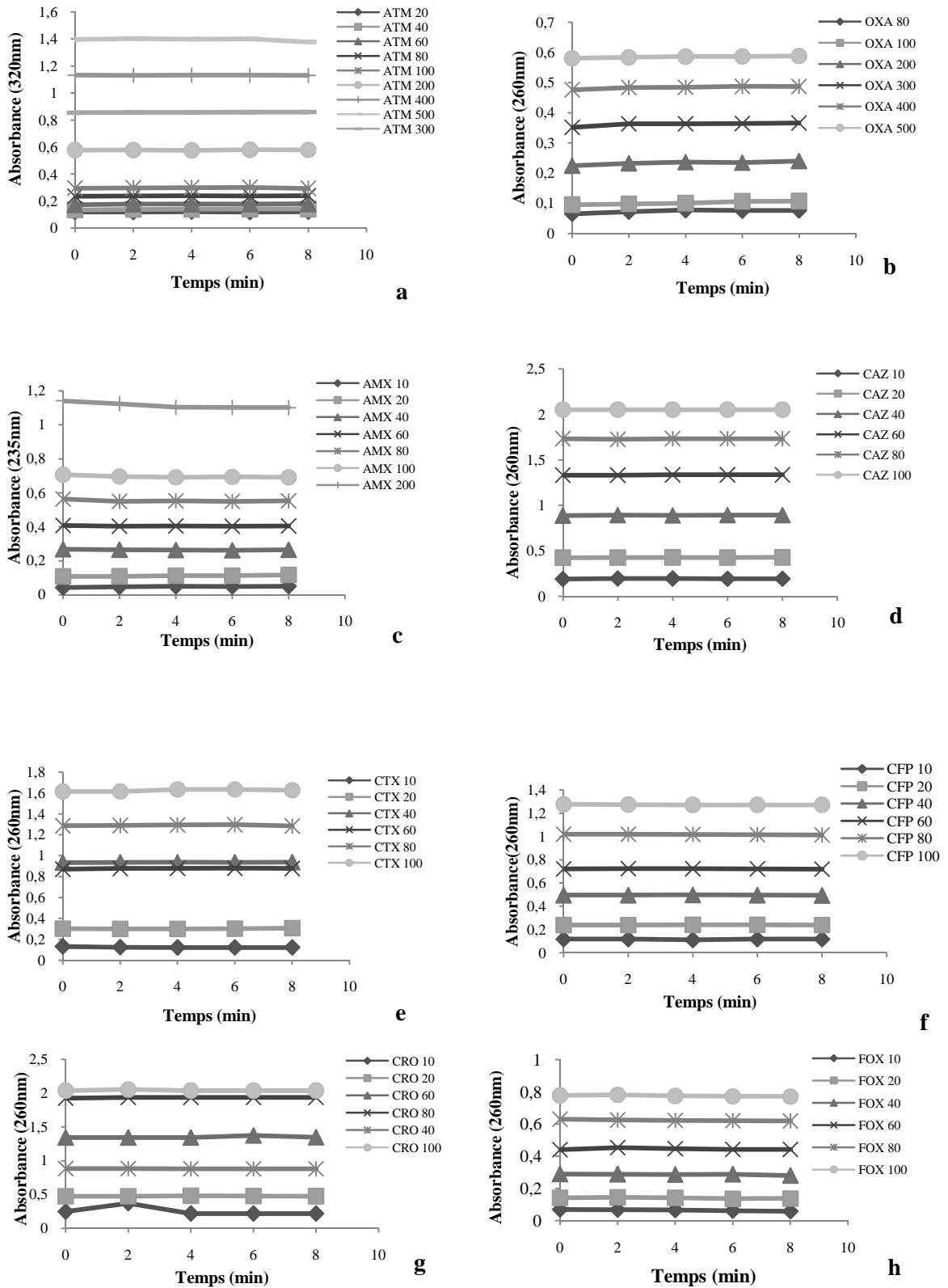


Figure 14: Variation de l'absorbance en fonction du temps à différentes concentrations en μM (a: ATM, b: OXA, c: AMX, d: CAZ, e: CTX, f: CFP, g: CRO, h: FOX).

4.2. Profil d'inhibition

4.2.1. Inhibition par le tazobactam (Substrat piperacilline)

D'après les résultats obtenus dans la figure 15 et le tableau V, on note que l'activité enzymatique est presque totalement inhibée par le tazobactam en dégradant la piperacilline.

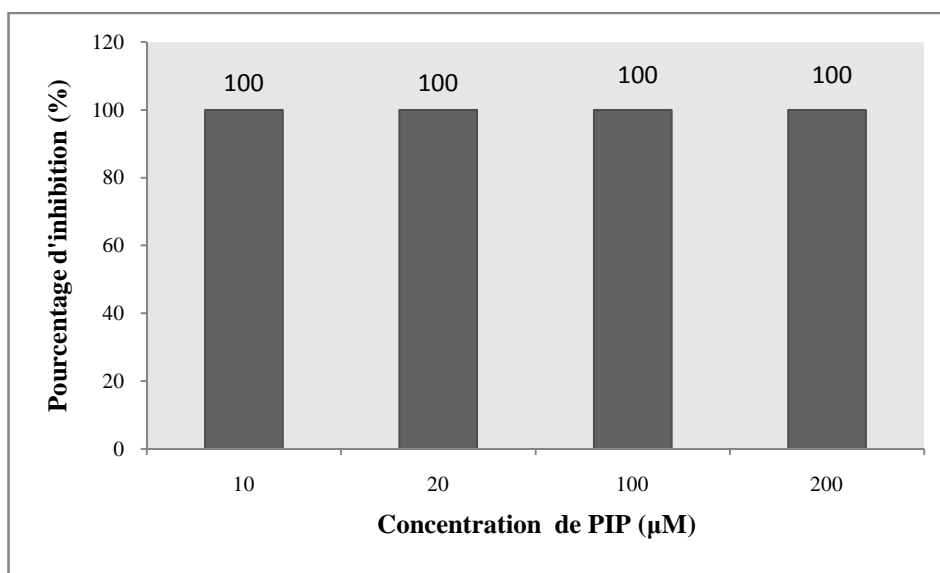


Figure 15: Pourcentage d'inhibition des β-lactamases par tazobactam (substrat piperacilline).

Tableau VIII: Vitesses d'hydrolyse de la piperacilline en présence et en absence de tazobactam.

| Pipéracilline (μM) | Vitesse (μmol/L /min) | |
|--------------------|-----------------------|--------------|
| | - Tazobactam | + Tazobactam |
| 10 | 2,9 ± 1,1 | 0 ± 0 |
| 20 | 9,7 ± 2,4 | 0 ± 0 |
| 100 | 4,3 ± 0,0 | 0 ± 0 |
| 200 | 6,4 ± 2,1 | 0 ± 0 |

4.2.2. Inhibition par l'acide clavulanique (substrat ticarcilline)

Selon les résultats obtenus dans la figure 16 et les vitesses calculées dans le tableau VI, l'acide clavulanique inhibe l'activité de β-lactamases d'*Acinetobacter baumannii*.

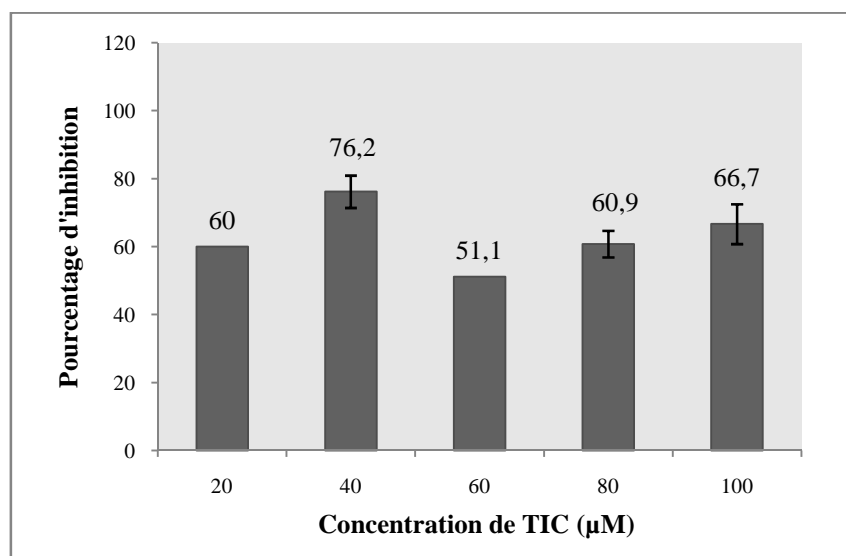


Figure 16: Pourcentage d'inhibition par l'acide clavulanique (substrat ticarcilline).

Tableau IX : Vitesses d'hydrolyse de la ticarcilline en présence et en absence de l'acide clavulanique.

| Ticarcilline (µM) | Vitesses (µmol/L /min) | |
|-------------------|------------------------|----------------------|
| | - acide clavulanique | + acide clavulanique |
| 20 | 3,8 ± 5,3 | 1,5 ± 0 |
| 40 | 7,9 ± 4,9 | 1,9 ± 0,4 |
| 60 | 17,0 ± 1,9 | 8,3 ± 0 |
| 80 | 19,3 ± 1,1 | 7,6 ± 0,7 |
| 100 | 19,3 ± 3,4 | 6,4 ± 1,1 |

En conclusion, on peut suggérer que l'extrait enzymatique contient une pénicillinase appartenant à la classe A, puisque nous avons obtenu une inhibition avec le tazobactam et l'acide clavulanique.

4.2.3. Inhibition par la cloxacilline

4.2.3.1. Substrat pénicilline G (200 µM)

D'après les résultats illustrés dans la figure 17 et le tableau X, la vitesse d'hydrolyse de la pénicilline G est diminuée en présence de la cloxacilline avec une activité résiduelle, ce qui peut s'expliquer par le fait que le substrat est hydrolysé par la céphalosporinase, mais également par une pénicillinase.

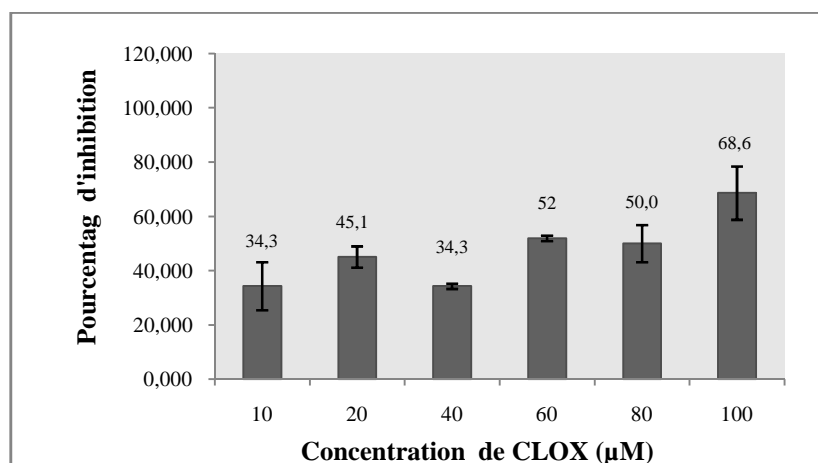


Figure 17: Pourcentage d'inhibition par la cloxacilline (substrat pénicilline G).

Tableau X: Vitesses d'hydrolyse de pénicilline G à 200 µM en présence de cloxacilline.

| Cloxacilline (µM) | Vitesses (µmol/L /min) |
|-------------------|------------------------|
| 0 | 32,9 ± 1,9 |
| 10 | 21,6 ± 2,9 |
| 20 | 18,1 ± 1,3 |
| 40 | 21,6 ± 0,3 |
| 60 | 15,8 ± 0,3 |
| 80 | 16,4 ± 2,2 |
| 100 | 10,3 ± 3,2 |

4.2.3.2. Substrat pipéracilline (200 µM)

Les résultats représentés dans la figure 18 et le tableau XI, montrent qu'en présence de la cloxacilline à différentes concentrations, les enzymes de l'extrait brut dégradant la pipéracilline sont inhibées totalement, ce qui suggère que cette β-lactamine est uniquement hydrolysée par une céphalosporinase.

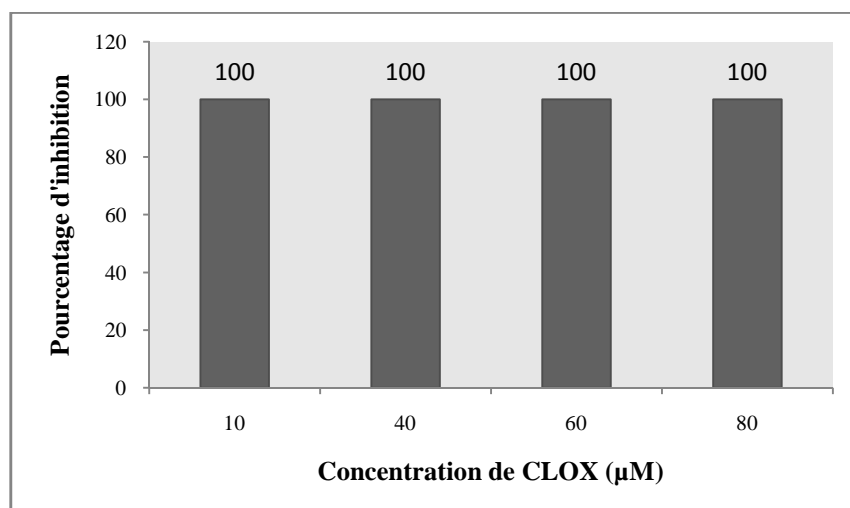


Figure 18: Pourcentage d'inhibition par la cloxacilline (substrat pipéracilline).

Tableau XI: Vitesses d'hydrolyse de pipéracilline à 200 μM en présence de la cloxacilline.

| Cloxacilline (μM) | Vitesses (μmol/L /min) |
|-------------------|------------------------|
| 0 | 6,4 ± 6,4 |
| 10 | 0 ± 0 |
| 40 | 0 ± 0 |
| 60 | 0 ± 0 |
| 80 | 0 ± 0 |

4.2.3.3. Substrat ticarcilline (200 μM)

En comparant les résultats obtenus dans la figure 19 et ceux du tableau XII, l'activité enzymatique vis-à-vis de la ticarcilline est diminuée en présence de la cloxacilline ce qui nous mène à conclure que ce substrat est hydrolysé par une céphalosporinase, mais également par une pénicillinase.

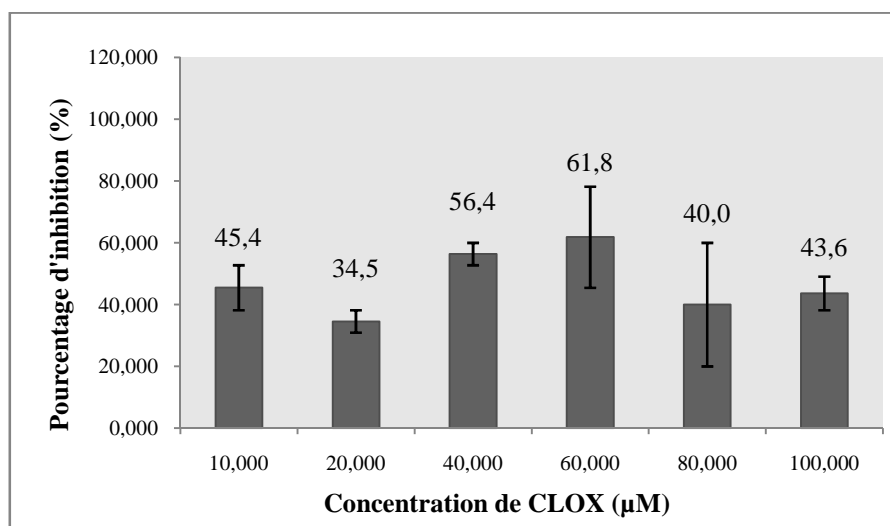


Figure 19 : Pourcentage d'inhibition par la cloxacilline (substrat ticarcilline).

Tableau XII: Vitesses d'hydrolyse de la ticarcilline à 200 μM en présence de la cloxacilline.

| Cloxacilline (μM) | Vitesses (μmol/L /min) |
|-------------------|------------------------|
| 0 | 20,8 ± 6,4 |
| 10 | 11,4 ± 1,5 |
| 20 | 13,6 ± 0,7 |
| 40 | 9,1 ± 0,7 |
| 60 | 7,9 ± 3,4 |
| 80 | 12,5 ± 4,2 |
| 100 | 11,7 ± 1,1 |

4. Substrat céfazoline (100 μM)

La figure 20 représente les pourcentages d'inhibition en présence de la cloxacilline en utilisant la céfazoline comme substrat et les vitesses d'hydrolyse de la céfazoline sont données dans le tableau XIII en présence de cloxacilline. Ces résultats révèlent que l'activité des β-lactamases est inhibée par la cloxacilline, même à de faibles concentrations (2 et 4 μM), suggérant que la céphalosporine est uniquement hydrolysée par une céphalosporinase.

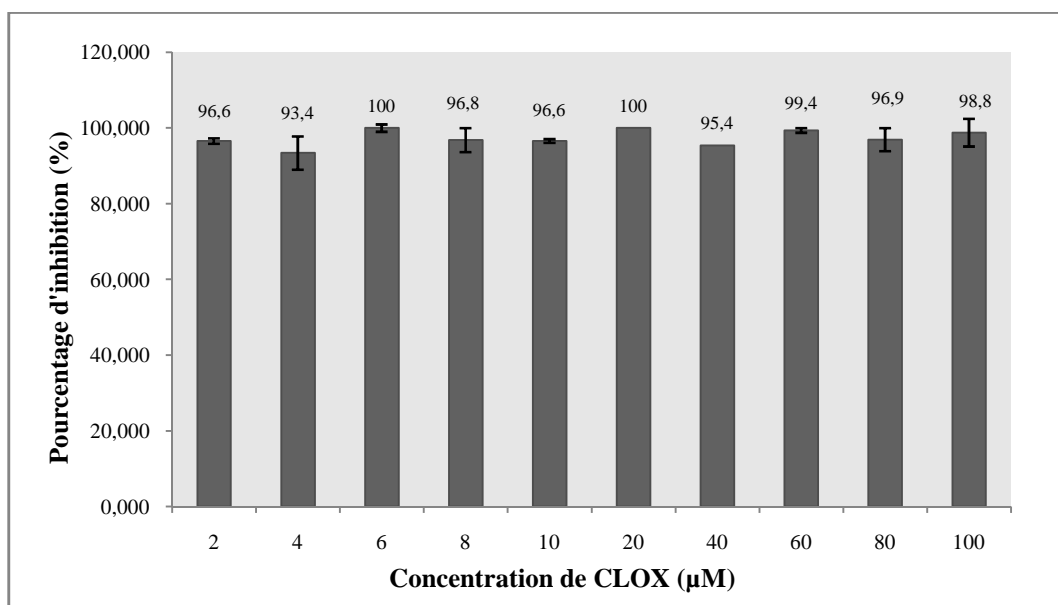


Figure 20 : Pourcentage d'inhibition par la cloxacilline (substrat céfazoline).

Tableau XIII: Vitesses d'hydrolyse de la céfazoline à 100 µM en présence de la cloxacilline

| Cloxacilline (µM) | Vitesses (µmol/L /min) |
|--------------------|------------------------|
| 0 | 266,2 ± 1 |
| 2 | 9,1 ± 1,9 |
| 4 | 17,5 ± 11,7 |
| 6 | 0 ± 2,6 |
| 8 | 8,4 ± 8,4 |
| 10 | 9,1 ± 1,3 |
| 20 | 0 ± 0 |
| 40 | 12,3 ± 0 |
| 60 | 1,6 ± 1,6 |
| 80 | 8,1 ± 8,1 |
| 100 | 3,2 ± 9,7 |

4.2.4. Inhibition par aztréonam

4.2.4.1. Substrat pénicilline G (200 µM)

La figure 21 et le tableau XIV montrent, que le degré d'hydrolyse de la pénicilline G est inhibé par l'aztréonam avec une activité résiduelle par rapport à celle obtenue en absence de l'aztréonam, ce qui confirme que la pénicilline G est hydrolysée par une céphalosporinase et aussi par une pénicillinase.

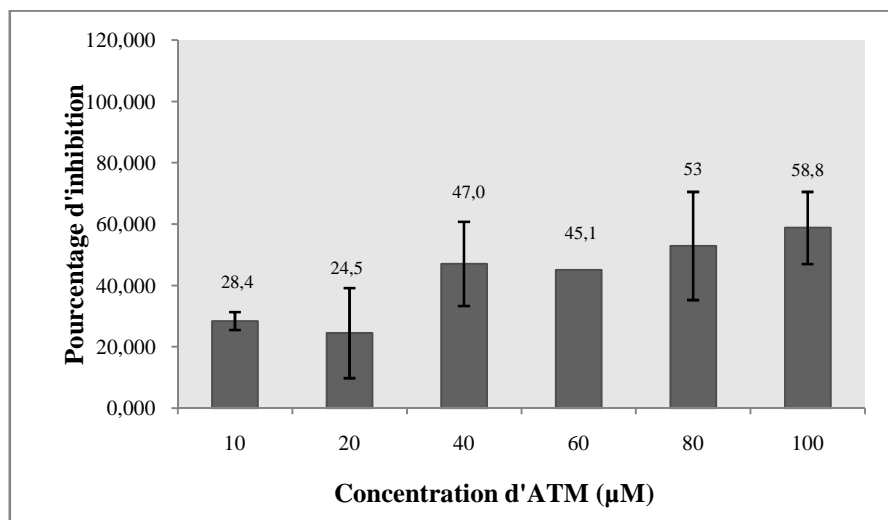


Figure 21 : Pourcentage d'inhibition par l'aztréonam (substrat pénicilline G).

Tableau XIV: Vitesses d'hydrolyse de pénicilline G à 200 μM en présence de l'aztréonam.

| Aztréonam (μM) | Vitesses (μmol/L /min) |
|-----------------|------------------------|
| 0 | 32,9± 1,9 |
| 10 | 23,5 ± 1 |
| 20 | 24,8 ± 4,8 |
| 40 | 17,4 ± 4,5 |
| 60 | 18,0 ± 0 |
| 80 | 15,5 ± 5,8 |
| 100 | 13,5 ± 3,9 |

4.2.4.2. Substrat céfazoline (100 μM)

La figure 22 et le tableau XV montrent, que le niveau d'hydrolyse de la céfazoline est diminué totalement en présence de l'aztréonam ce qui indique qu'une céphalosporinase de groupe 1 est probablement produite par la souche étudiée.

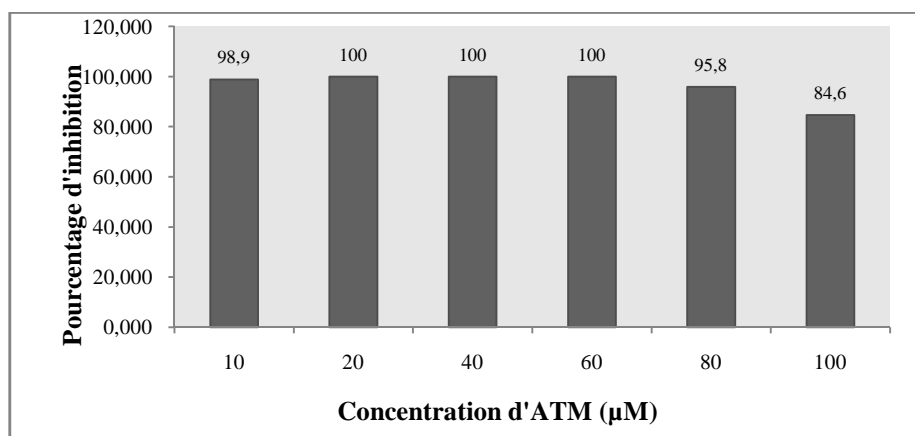


Figure 22: Pourcentage d'inhibition par l'aztréonam (substrat céfazoline).

Tableau XV: Vitesses d'hydrolyse de la céfazoline à 100 µM en présence de l'aztréonam.

| Aztréonam (µM) | Vitesses (µmol/L /min) |
|-----------------|------------------------|
| 0 | 266,2 ± 1 |
| 10 | 3,2 ± 0 |
| 20 | 0 ± 0 |
| 40 | 0 ± 0 |
| 60 | 0 ± 0 |
| 80 | 11,0 ± 0 |
| 100 | 40,8 ± 0 |

4.2.5. Inhibition par EDTA à 10µM (Substrat céfazoline)

Selon la figure 23 et les vitesses de dégradation de la céfazoline en présence ou en absence d'EDTA (tableau XVI), on note que l'EDTA n'affecte pas l'activité enzymatique ce qui indique que l'enzyme dégradant la céfazoline c'est pas une métallo-β-lactamase.

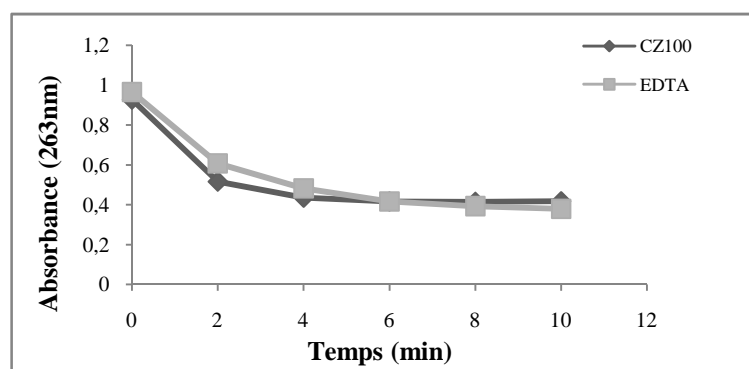


Figure 23: Diminution de l'absorbance en présence et en absence d' EDTA (substrat céfazoline).

Tableau XVI: Vitesses d'hydrolyse de céfazoline à 100 μM en présence d'EDTA.

| EDTA (mM) | Vitesse ($\mu\text{mol/L /min}$) | |
|-----------|------------------------------------|------------------|
| | - EDTA | + EDTA |
| 10 | 266,212 \pm 1 | 232,1 \pm 19,4 |

4.2.6. Inhibition par NaCl à 100 μM (Substrat céfazoline)

Selon les résultats obtenus (figure 24, tableau XVII), le NaCl n'a aucun effet sur l'activité de l'extrait enzymatique en utilisant la cefazoline comme substrat ce qui indique que cette enzyme n'est pas du groupe 2d (classe D).

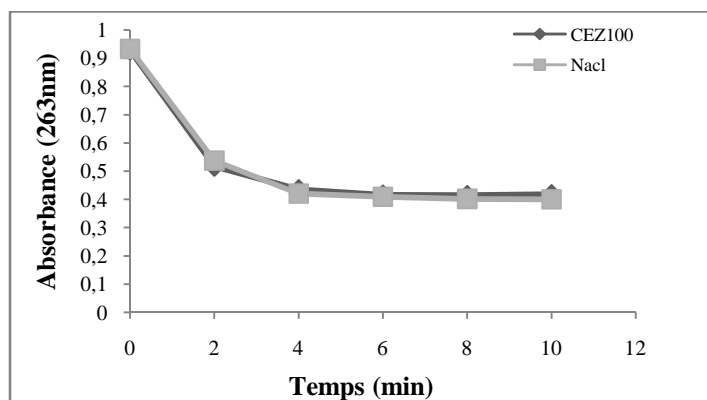


Figure 24: Diminution de l'absorbance en présence et en absence de NaCl (substrat céfazoline).

Tableau XVII : Vitesses d'hydrolyse de céfazoline à 100 μM en présence de NaCl.

| NaCl (mM) | Vitesse ($\mu\text{mol/L /min}$) | |
|-----------|------------------------------------|-----------------|
| | - NaCl | + NaCl |
| 100 | 266,2 \pm 1 | 256,2 \pm 0,6 |

Le tableau XVIII récapitule les pourcentages d'inhibition des différents inhibiteurs

Tableau XVIII: Pourcentages d'inhibition à 100 (CEZ) ou 200 μM du substrat.

| Substrat | Inhibiteur | | | |
|----------|------------|-------------|--------------|-----------|
| | Tazobactam | Clavulanate | Cloxacilline | Aztréonam |
| PIP | 100 | / | 99,99 | / |
| TIC | / | 66,66 | 43,63 | / |
| PEG | / | / | 68,62 | 58,82 |
| CEZ | / | / | 98,78 | 84,65 |

5. Electrophorèse native et zymogramme

Le poids moléculaire ainsi que le nombre d'enzymes produites par la bactérie peuvent être estimés en utilisant l'électrophorèse sous des conditions non dénaturantes couplée à une méthode iodométrique (zymogramme).

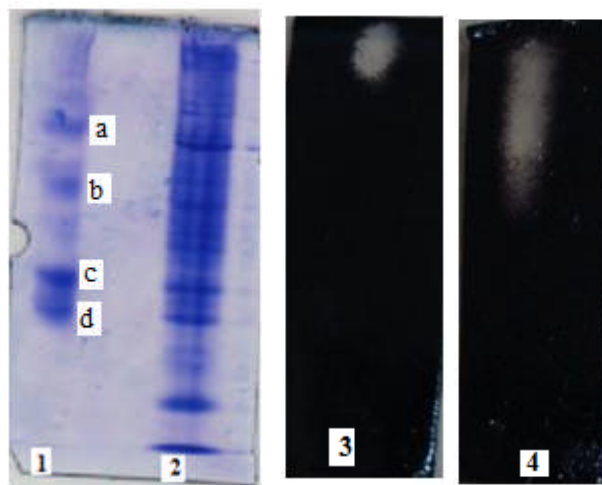
La figure 25 montre que la bactérie produit plus d'une enzyme dont les poids moléculaires sont estimés en utilisant la courbe d'étalonnage (annexe IV):

- **Gel de cefazoline**

La distance entre le milieu de la bande et la limite supérieure du gel de séparation est de 1cm et la $M_r=0,222$. Le poids moléculaire est approximativement de 67 kDa.

- **Gel de pénicilline G**

La distance entre le milieu de la bande et la limite supérieure du gel de séparation est de 1,7cm et la $M_r=0,377$. Le poids moléculaire approximativement de 44,5 kDa.



a : BSA (67 kDa), **b**: Ovalbumine (43 kDa), Carbonique anhydrase (29 kDa), **d**: Ribonucléase (13,7 kDa).

Figure 25: Gel d'électrophorèse et zymogramme (**1** : les standards, **2** : l'extrait brut, **3** : gel préparé avec cefazoline, **4** : gel préparé avec pénicilline G).

6. Discussion

Acinetobacter baumannii est un microorganisme pathogène opportuniste, qui est fréquemment impliqué dans les infections nosocomiales qui sont généralement : septicémie, pneumonie et infection urinaire. Cette bactérie peut représenter une menace importante due à sa multi-résistance aux antibiotiques (Héritier *et al.*, 2005; Poirel et Nordmann, 2006).

Tous les mécanismes de résistance aux β -lactamines, telles que la production de β -lactamases, la modification de la cible, la réduction du niveau de pénétration à travers la membrane externe et le mécanisme d'efflux sont décrits dans les espèces d'*Acinetobacter* (Perilli *et al.*, 1996; Wieczorek1 *et al.*, 2008).

A. baumannii produit des céphalosporinases naturelles de type AmpC responsables de la résistance aux amino- et aux ureidopenicillines, aux céphalosporines à spectre étroit et aux cephamycines. Les oxacillinases (OXA) appartenant à la classe D d'Ambler, généralement codés par des plasmides, peuvent être produites. Cependant les oxacillinases chromosomiques ont été rapportées. Une analyse d'un isolat multi-résistant d'*A. baumannii* a démontré que cette bactérie produit une β -lactamase de classe A d'Ambler à spectre élargi (BLSE) (Perilli *et al.*, 1996; Héritier *et al.*, 2005). En outre les *A. baumannii* peuvent synthétiser des β -lactamases à spectre large de la classe A tels que TEM-1 et TEM-2 (Poirel et Nordmann, 2008).

L'objectif de cette étude est la caractérisation biochimique des β -lactamases produites par une souche hospitalière isolée au niveau du laboratoire de bactériologie médicale du CHU de Tizi Ouzou (Algérie), en se basant sur le profil de substrat et d'inhibition.

Les résultats de la sensibilité aux antibiotiques ont montré que la souche étudiée résiste aux CTX, CAZ, FEP et CPO, cependant elle est sensible à l'IMP ce résultat correspond au résultat obtenu par Seifert *et al.* (1993). Selon Zhou *et al.* (2007) l'imipénème est hydrolysé par des carbapénèmases de la classe B ou D qui peuvent être présentes chez les souches d'*Acinetobacter*. Toutefois, le résultat de l'antibiogramme obtenu dans notre étude, indique que la souche d'*Acinetobacter baumannii* ne produit pas la carbapénémase, ce qui signifie que cette possibilité peut être éliminée à ce stade.

Selon Livermore et Woodford, (2006), le nombre de souches d'Acinetobacter qui synthétisent les β -lactamases de type BLSE est faible. Dans la présente étude nous avons observé l'absence d'image de synergie, par conséquent, la souche étudiée ne produit pas de β -lactamases à spectre élargi (BLSE).

▪ **Test de détection sur gel d'iode**

Le résultat de ce test, a montré l'apparition de zones transparentes sur les géloses contenant la pénicilline G et céfazoline, ce qui indique que la souche produit probablement une céphalosporinase ou une pénicillinase.

Le test iodométrique sur milieu solide effectué par Petersson *et al.* (1989) a montré qu'en utilisant la pénicilline G comme substrat, l'hydrolyse de ce dernier est indiquée par la décoloration à moins de 15 min autour des colonies de *Staphylococcus* et *Micrococcus* synthétisant des β -lactamases, et au bout de 60 min une décoloration totale du milieu est observée, ce qui concorde avec les résultats obtenus dans notre étude, dont la décoloration est effectuée après 10 min de dépôt de l'extrait brut et la décoloration totale au bout de 24 h.

▪ **Profil de substrat et d'inhibition**

La caractéristique la plus importante de toutes les β -lactamases est leur capacité à hydrolyser les β -lactamines. Etant donné que l'activité hydrolytique (profil de substrat) et le profil d'inhibition ont été employés en tant que paramètres principaux dans la classification et la caractérisation des β -lactamases. Dans la présente étude, ces paramètres sont utilisés pour caractériser les β -lactamases produites par la souche étudiée (Bush et Sykes, 1986 ; Bush *et al.*, 1995).

La classification fonctionnelle (Bush *et al.*, 1995) consiste à classer les β -lactamases selon le profil de substrat et d'inhibition. Dans le présent travail, on essaiera d'utiliser les caractéristiques de chaque groupe pour donner le groupe ou les groupes auxquels appartiennent les β -lactamases produites par cette souche.

Tableau XIX: Récapitulation de profil de substrat et d'inhibition de β -lactamases produites.

| | Substrat | | | | | | | | | | | | Inhibiteur | | | |
|----------|---------------|--------------|---------------|------------|-------------|------------|-----------|-------------|------------|-------------|-----------|------------|--------------------|------------|--------------|-----------|
| | Pénicilline G | Ticarcilline | Pipéracilline | Céfazoline | Ceftazidime | Céfotaxime | Cefpirome | Ceftriaxone | Cefoxitine | Amoxicillie | Aztréonam | Oxacilline | Acide clavulanique | Tazobactam | Cloxacilline | Aztréonam |
| Classe A | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | - | - |
| Classe C | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | Nd | Nd | + | + |

Nd, non déterminé, + ; hydrolysé ou inhibée , - ; non hydrolysé ou non inhibée

Dans notre étude le profil de substrat et d'inhibition ont été étudiés (tableau XIX), et parmi les douze antibiotiques testés, quatre antibiotiques, uniquement sont hydrolysés : la pénicilline G, céfazoline, ticarcilline et pipéracilline dont la pénicilline G et céfazoline sont hydrolysées à des taux élevés et que la céfazoline est plus dégradée que la pénicilline G, ce qui indique, probablement, que la souche étudiée produit au moins une céphalosporinase et une pénicillinase.

L'extrait enzymatique utilisé dans notre cas, peut contenir plusieurs enzymes qui peuvent dégrader les mêmes substrats, et pour cette raison, nous avons comparé les pourcentages d'inhibition par l'acide clavulanique, le tazobactam, la cloxacilline et l'aztréonam en utilisant les substrats hydrolysés pour déterminer le nombre probable d'enzymes et même leur profil de substrat et d'inhibition. Ces résultats peuvent être confirmés par l'étude du profil électrophorétique. Ce qui nous a permis, ainsi, de suggérer les classes moléculaires et les groupes fonctionnels auxquels appartiennent les β -lactamases produites par la souche étudiée.

L'acide clavulanique est un inhibiteur des β -lactamases de groupe 2 (classe A). En utilisant la ticarcilline comme substrat, une activité résiduelle est remarquée ce qui indique, probablement, que la ticarcilline est hydrolysée par plus d'une seule enzyme, et comme l'une des enzymes est inhibée par l'acide clavulanique, nous pouvons suggérer que l'enzyme synthétisée peut appartenir au groupe 2.

Tazobactam, inhibiteur efficace des β -lactamases de classe A qui correspond au groupe 2 à part le sous-groupe 2d. Tazobactam a également une faible activité sur quelques β -lactamases de classe C qui correspond au groupe 1 (Buynak, 2006). Nos résultats

montrent que l'inhibition par tazobactam est totale, ce qui indique, probablement, que la pipéracilline est dégradée par une enzyme qui appartient à la classe moléculaire A ou C.

La cloxacilline et aztréonam sont des inhibiteurs de β -lactamases de classe C (groupe 1).

Les résultats d'inhibition par cloxacilline et aztréonam, en utilisant la pénicilline G, pipéracilline, ticarcilline et céfazoline comme substrats ont montré :

Pour la pénicilline G une diminution de l'activité enzymatique avec une activité résiduelle élevée (faible pourcentage d'inhibition) en présence de la cloxacilline comme inhibiteur. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus tout en utilisant l'aztréonam comme inhibiteur, ce qui nous mène à suggérer que cet antibiotique est hydrolysé à un faible niveau par une enzyme appartenant au groupe 1 (classe C d'Ambler).

Concernant la pipéracilline, le niveau de son hydrolyse est diminué en présence de tazobactam ce qui signifie que cette β -lactamine est hydrolysée par une β -lactamase appartenant à la classe A, de plus, son niveau d'hydrolyse est diminué en présence de cloxacilline ce qui indique la présence d'enzymes de type céphalosporinase appartenant à la classe C qui hydrolyse la pipéracilline.

Pour la ticarcilline, une diminution des valeurs de vitesses d'hydrolyse à différentes concentrations en ajoutant la cloxacilline est constatée ; ceci indique que la cloxacilline inhibe l'enzyme en dégradant la ticarcilline. L'activité résiduelle remarquée peut être due à la dégradation de la ticarcilline par deux enzymes différentes ; l'une est inhibée par la cloxacilline et l'autre non inhibée. Ces enzymes peuvent être classées dans le groupe 2 (classe A) et le groupe 1 (classe C d'Ambler) et cela en comparant ce résultat avec celui obtenu en utilisant l'acide clavulanique comme inhibiteur.

En absence d'inhibiteur la vitesse d'hydrolyse de la céfazoline est très élevée (par rapport aux autres antibiotiques), ce qui suggère que la souche d'Acinetobacter étudiée produit une éventuelle céphalosporinase. L'étude de l'inhibition par la cloxacilline et l'aztréonam en présence de la céfazoline a montré que ce dernier est éventuellement hydrolysé par une β -lactamase qui appartient à la classe C d'Ambler. Les résultats d'inhibition par cloxacilline et aztréonam sont similaires en présence de la céfazoline comme substrat.

D'après les résultats obtenus on suggère que la souche d'*Acinetobacter baumannii* étudiée peut synthétiser deux types d'enzymes (pénicillinase et céphalosporinase) appartenant au groupe 2 et au groupe 1 (classe C). Leurs profils de substrat et d'inhibition sont récapitulés dans le tableau XIX.

Cependant, en comparant le profil de substrat et d'inhibition des enzymes produites ainsi que les résultats obtenus pour le test de synergie qui montrent que la souche étudiée ne produit pas de BLSE et comme les sous groupes: 2a, 2be, 2br, 2c, 2e et 2f sont du type BLSE, cela laisse supposer que l'enzyme dégradant la pénicilline G est une enzyme de groupe 2b qui regroupe les pénicillinases à spectre large (TEM-1, TEM-2, SHV-1) (Bush, 1989 ; Bush *et al.*, 1995).

En comparant les résultats obtenus pour les cinétiques des enzymes produites et ceux obtenus pour l'antibiogramme dont la souche est résistante aux CTX, CPO et CAZ et ATM, cependant son extrait enzymatique n'hydrolyse pas ces derniers, ceci nous permet de conclure que la souche étudiée peut utiliser d'autres mécanismes de résistances à savoir : mécanisme d'efflux, modification de la cible (PLP) ... (Perilli *et al.*, 1996; Wiczorek *et al.*, 2008).

Le test d'EDTA et NaCl en utilisant la céfazoline comme substrat montre que l'enzyme dégradant la céfazoline n'est pas inhibée par l'EDTA et NaCl, ce qui indique que l'enzyme dégradant la céfazoline n'appartient pas à la classe B ou D d'Ambler (Bush, 1989).

Le profil obtenu pour la pénicillinase supposée ressemble aux profils obtenus par certains auteurs:

Poirel *et al.* (2007), ont caractérisé une nouvelle pénicillinase SCO-1 d'*Acinetobacter* spp. Cette enzyme hydrolyse fortement la pénicilline G (K_{cat} 150 s⁻¹) et faiblement la céfotaxime, le ceftazidime et la céphalotine. L'imipénème et les monobactams sont non hydrolysés. Comme elle dégrade la ticarcilline à K_{cat} de 35 s⁻¹ et piperacilline $K_{cat} = 0.4$ s⁻¹ cette enzyme appartient à la classe A, elle est inhibée par l'acide clavulanique.

Dans notre cas la dégradation de la pénicilline G est de 36,7 $\mu\text{mol/L/min}$ et pour la ticarcilline elle est de 20,8 $\mu\text{mol/L/min}$ et l'activité enzymatique elle est inhibée par l'acide clavulanique.

Selon Thomson *et al.* (1990), TEM-1 et SHV-1 hydrolysent la pipéracilline plus que la ticarcilline. Dans notre étude, c'est la ticarcilline qui est plus hydrolysée que la pipéracilline, c'est le cas de la β -lactamase PSE-1 qui appartient au groupe 2c correspondant à la classe moléculaire A (Bush *et al.*, 1995). La résistance au ticarcilline-clavulanate est probablement due à l'hydrolyse rapide du ticarcilline par l'enzyme produite par la souche d'*Acinetobacter* (Thomson *et al.*, 1990).

L'étude effectuée par Bush *et al.* (1993) montre que l'inhibition par l'acide clavulanique est comparable à celle réalisée par le tazobactam pour les β -lactamases de la classe A (PC1, TEM-1, TEM-2 et TEM-3). La P99 qui est une céphalosporinase de groupe 1 a un IC50 plus faible pour le tazobactam et plus élevé pour l'acide clavulanique. Cependant les enzymes appartenant au groupe 2 sont inhibées à de faibles concentrations en inhibiteurs (tazobactam et acide clavulanique) et en comparant nos résultats avec ceux obtenus par Bush *et al.* (1993), nous pouvons suggérer que la souche étudiée synthétise une β -lactamase appartenant au groupe 2.

En comparant nos résultats avec le tableau récapitulatif de Bush *et al.* (1995) nous pouvons suggérer que la souche étudiée peut synthétiser une céphalosporinase appartenant au groupe 1 (classe moléculaire C). Ces enzymes sont à l'origine nommées des céphalosporinases à cause de leur substrats préférés qui sont les céphalosporines. Cependant, une activité hydrolytique élevée sur des pénicillines peut être observée. Les céphalosporinases du groupe 1 sont essentiellement rencontrées chez les bactéries Gram négatif (Fenollar-Ferrer *et al.*, 2008).

Selon Corvec *et al.* (2003), les souches d'*Acinetobacter ssp* peuvent produire des céphalosporinases chromosomiques appartenant à la classe moléculaire C qui peuvent être constitutives ou induites.

Then et Angehrn, (1982), ont montré que les céphalosporinases de *P. aeruginosa* (bacille Gram négatif non fermentaire) appartenant au groupe 1 selon Bush *et al.* (1995), hydrolysent la céphalotine (C1G), à un pourcentage de 400, 480, 500 et 670 % pour différentes souches étudiées par rapport à la pénicilline G. Ces résultats coïncident avec

nos résultats qui montrent que la céfazoline est hydrolysée à un niveau élevé par rapport à la pénicilline G et le niveau d'inhibition par cloxacilline et aztréonam est d'environ 50% ; ce qui indique que la céphalosporinase produite par la souche étudiée hydrolyse la pénicilline G à environ 50% de l'activité totale de l'extrait enzymatique.

L'enzyme ADC-7 de la classe C produite par *Acinetobacter baumannii* hydrolyse la céphalotine et la céphaloridine à des vitesses élevées et la céfoxitine à une vitesse faible. Toutefois, le céfotaxime, la ceftazidime, l'imipénème et l'aztréonam ne sont pas hydrolysés. De plus elle est inhibée par l'aztréonam (Hujer *et al.*, 2005). Ce qui correspond aux résultats de la présente étude dont l'enzyme supposée est une céphalosporinase du groupe 1 hydrolyse la céfazoline à un niveau élevé mais pas la céfotaxime, la ceftazidime et l'aztréonam, elle est toutefois inhibée par l'aztréonam.

Selon Philippon *et al.* (2002), les β -lactamases du type AmpC, hydrolysent les β -lactamines C1G plus que la pénicilline G et ces enzymes peuvent hydrolyser très faiblement la ticarcilline, la céfotaxime, la ceftazidime, la céfoxitine et l'aztréonam. Ces enzymes sont inhibées par la cloxacilline et l'aztréonam. Ces résultats coïncident avec les résultats obtenus par l'étude effectuée sur la souche d'*Acinetobacter baumannii*, ceci nous permet de déduire que la bactérie étudiée peut produire une céphalosporinase appartenant à ce groupe de β -lactamases.

Perilli *et al.* (1996), ont caractérisé des céphalosporinases chromosomiques appartenant au groupe 1 d'*A. lowffii* ULA-501, d'*A. baumannii* ULA-187 et d'*A. baumannii* AC-14, les céphalosporinases de ces souches n'hydrolysent pas la pénicilline G, la céfotaxime et le cefpirome cependant, les enzymes d'*A. baumannii* ULA-187 et d'*A. baumannii* AC-14 hydrolysent la céphalotine avec un Kcat élevé. En revanche, ils ont remarqué que l'aztréonam représente un inhibiteur temporaire.

Ces résultats diffèrent des résultats obtenus dans notre étude, où la céphalosporinase supposée est inhibée par l'aztréonam. Le profil de ces enzymes ressemble au profil du substrat obtenu dont l'enzyme étudiée n'hydrolyse pas la céfotaxime et le cefpirome.

Nos résultats diffèrent également des résultats obtenus par Bou et Martínez-Beltrán, (2000) sur *Acinetobacter baumannii*, où l'enzyme de type AmpC utilisée est partiellement purifiée. Ces résultats montrent que la céphaloridine est hydrolysée plus

rapidement que l'ampicilline. La céfotaxime et la ceftazidime sont faiblement hydrolysées. Toutefois la céfoxitine et l'imipénème sont non hydrolysés.

Les tests d'inhibition par l'acide clavulanique et la tazobactam montrent une inhibition modérée qui est une caractéristique du groupe fonctionnel 1; cependant ce profil a des points communs avec la céphalosporinase supposée produite par la souche étudiée en particulier l'hydrolyse de la céfazoline (C1G). De plus elle ne dégrade pas la céfoxitine et l'imipénème pour lesquels la souche est sensible.

Le profil de substrat obtenu dans la présente étude ressemble beaucoup plus aux résultats obtenus pour les céphalosporinases des trois souches d'*Acinetobacter calcoaceticus* citées par Bush *et al.*(1995). Ces enzymes hydrolysent les C1G à un pourcentage élevé par rapport à la pénicilline G ; cependant la céfotaxime, la ceftazidime, l'aztréonam, l'oxacilline et l'imipénème sont non hydrolysés (Hirai *et al.*, 1980; Hikida *et al.*, 1988 ; Blehschmt *et al.*, 1992).

Le profil d'inhibition montre que toutes ces enzymes sont soit inhibées par l'aztréonam ou par la cloxacilline ou les deux inhibiteurs à la fois, c'est le cas de la céphalosporinase supposée présente chez la souche étudiée.

Dans le but de déterminer le nombre d'enzyme et d'estimer le poids moléculaire, nous avons utilisé une électrophorèse native couplée à un test iodométrique.

Le résultat de ce test montre qu'il existe plus d'une seule bande et les niveaux de ces bandes sont différents pour la pénicilline G et la céfazoline.

Les bandes obtenus se chevauchent pour la pénicilline G, ce qui nous permet de déduire que l'extrait brut peut contenir deux enzymes de poids moléculaire différents et que l'enzyme dégradant la céfazoline supposée comme céphalosporinase peut hydrolyser la pénicilline G. L'enzyme supposée comme pénicillinase n'hydrolyse pas la céfazoline.

Les poids moléculaires estimés sont supérieurs aux poids moléculaires cités dans la littérature. La pénicillinase dans la présente étude possède un poids moléculaire d'environ 44,5 kDa pour la pénicillinase (groupe 2b) et pour la céphalosporinase (groupe 1), il est de 67 kDa.

Les poids moléculaires donnés par Zeba, (2005) sont entre 22 et 36 kDa pour les pénicillinases et de 40 kDa pour les céphalosporinases et selon Bush *et al.* (1995), les poids moléculaires pour les enzymes du groupe 2b sont entre 19 et 36 kDa tandis que pour les

enzymes du groupe 1 sont entre 29 et 43 kDa et d'après ces données les poids moléculaires des céphalosporinases sont généralement plus élevés que les pénicillinases du groupe 2b, ce qui est observé dans les résultats obtenus dans notre étude.

Les poids moléculaires estimés dans notre cas sont très élevés par rapports à ceux donnés dans la littérature qui peuvent être dus, au fait, que nous avons utilisé un extrait enzymatique brut et non pas des enzymes partiellement ou totalement purifiée comme le cas de la plupart des études effectuées sur les β -lactamases. Citons par exemple la céphalosporinase caractérisée par Fujii-Kuriyama *et al.* (1977) où ils ont utilisé une β -lactamase purifiée 100 fois et le poids moléculaire déterminé par électrophorèse est de 40 kDa. Mais selon Lechschmidt *et al.* (1992) les céphalosporinases d'*Acinetobacter calcoaceticus* peuvent avoir un poids moléculaire supérieur à 1000 kDa.

Le profil observé pour les SHV-1 et AmpC par Eftekhar et Rafice , (2006) utilisant le test iodométrique ressemble au profil obtenus dans notre étude.

Conclusion

L'étude de l'antibiogramme et le test de synergie de la souche d'*Acinetobacter baumannii* a révélé que cette dernière résiste à tous les antibiotiques testés à l'exception de l'imipénème, ce qui signifie que la souche étudiée ne produit pas de carbapénimase ni de β -lactamases de type BLSE.

L'étude de profil de substrat a montré que l'extrait enzymatique hydrolyse :

La pénicilline G, la ticarcilline, la piperacilline et la céfazoline. La céfazoline et la pénicilline G sont les plus hydrolysées. Cependant l'aztréonam, l'oxacilline, la céfoxitine, la céfotaxime, la ceftriaxone, la céftazidime, et le cefpirome ne sont pas hydrolysés. Cette souche résiste au céfotaxime, au céftazidime et au cefpirome mais elle ne les hydrolyse pas, ce qui suggère que cette souche peut utiliser d'autres mécanismes de résistance tels que la pompe à efflux et la modification de la cible.

L'étude du profil d'inhibition a montré que le tazobactam et l'acide clavulanique sont des inhibiteurs de l'extrait enzymatique, ce qui indique la présence de β -lactamase appartenant au groupe 2.

La cloxacilline et l'aztréonam inhibent les enzymes de l'extrait enzymatique en utilisant les substrats piperacilline, céfazoline, pénicilline G et ticarcilline ce qui indique que la souche produit une β -lactamase de groupe 1.

La comparaison des résultats obtenus en utilisant les inhibiteurs a permis d'établir le profil de substrat et d'inhibition des enzymes produites par *Acinetobacter baumannii* :

- Une céphalosporinase appartenant au groupe 1, correspondant à la classe moléculaire C.
- Une pénicillinase probablement de groupe 2b.

Le zymogramme et l'électrophorèse montrent que la souche étudiée synthétise plus d'une seule β -lactamase avec des poids moléculaires différents, 67 kDa pour la céphalosporinase et 44,5 kDa pour la pénicillinase.

Les résultats obtenus dans cette étude concernant la caractérisation restent préliminaires. Des études complémentaires approfondies peuvent être envisagées qui se résument comme suit :

- Purification des enzymes : Chromatographie échangeuse d'ions, chromatographie d'affinité et chromatographie d'exclusion peuvent être utilisées.
- Détermination des paramètres cinétiques (K_m , V_{max} et K_{cat}) en utilisant des enzymes pures.
- Utilisation d'iso-électrofocalisation pour déterminer le point isoélectrique .
- Séquençage de ces enzymes.

Cependant la caractérisation complète pour déterminer avec exactitude le type d'enzymes produites par cette souche nécessitera une étude moléculaire afin d'identifier les gènes codant pour ces enzymes.

Références bibliographique

Références bibliographiques

- Akova M.** (2008). Sulbactam-containing β -lactamase inhibitor combinations. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, **14 (Suppl.1)**: 185-188.
- Ali Shah A., Hasan F., Ahmed S. and Hameed A.** (2004). Characteristics, epidemiology and clinical importance of emerging strains of Gram-negative bacilli producing extended-spectrum β -lactamases. *Research in Microbiology*, **155**: 409- 421.
- Ambler R.P.** (1980). The structure of β -lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, **B289**: 321-331.
- Ambler R. P., Coulson A. F. W., Frère J. M., Ghuysen J. M., Joris B., Forsman M., Leveque R. C., Tiraby G. and Waley S. G.** (1991). A standard numbering scheme for the Class A β -lactamases. *Biochemical Journal*, **276**: 269- 270.
- Arlet G. et Philippon A.** (2003). Les nouvelles β -lactamases à l'aube du troisième millénaire. *Revue Française des Laboratoires*, (352): 41- 55.
- Babic M., Hujer A. M., Bonomo R. A.** (2006). What's new in antibiotic resistance? Focus on β -lactamases. *Drug Resistance Updates*, **9**:142- 156.
- Bauvois C., Ibuka A. S., Celso A., Alba J., Ishii Y., Frère J.M. and Galleni M.** (2005). Kinetic Properties of Four Plasmid-Mediated AmpC β -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **49** (10): 4240-4246.
- Bebrone C.** (2007).Metallo- β -lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. *Biochemical Pharmacology*; **74**: 1686-1701.
- Ben Achour N., Chouchani C., Bouhawela N., Amor A. et Belhadj O.** (2007). Identification d'une ceftazidimase plasmidique produite par une souche clinique de *Proteus mirabilis*. *Pathologie biologique*, Article in press.
- Bonomo R. A., Dawes C. G., Knox J. R. and Shlaes D. M.** (1995). β -lactamase mutations far from the active site influence inhibitor binding. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1247**: 121-125.

Bonomo R. A. and Rice L. B. (1999). Inhibitor resistant class a β -lactamases. *Frontiers in Bioscience*, **4**: 34-41.

Bou G. and Martínez-Beltrán J. (2000). Cloning, nucleotide sequencing, and analysis of the gene encoding an AmpC β -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **44** (2): 428-432.

Bounaga S., Laws A. P., Galleni M. and Page M. I. (1998). The mechanism of catalysis and the inhibition of the *Bacillus cereus* zinc-dependent β -lactamase. *Biochemical Journal*, **331**: 703-711.

Bradford P. A. (2001). Extended-Spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important Resistance threat. *Clinical Microbiology Reviews*, **14** (4): 933-951.

Bryskier A. (1999). Antibiotiques et agents antibactériens: classification et relation structure activité. *In* : Antibiotiques, agents antibactériens et antifongiques. Ed. Ellipses, Paris, P: 54-57.

Bush K. (1989). Characterization of β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **33** (3): 259-263.

Bush K. (1989). Classification of β -Lactamases: Groups 2c, 2d, 2e, 3, and 4. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **33** (3): 271-276.

Bush K. (1989). Characterization of β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **33** (3): 259-263.

Bush K. and Sykes R. B. (1986). Methodology for the study of β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **30** (1): 6-10.

Bush K., Jacoby G. A. and Medeiros A. A. (1995). A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **39** (6): 1211-1233.

Bush K., Macalintal C., Rasmussen B. A., Lee V. J. and Yang Y. (1993). Kinetic interactions of tazobactam with β -Lactamases from all major structural classes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **37** (4): 851- 858.

Buynak J. D. (2006). Understanding the longevity of the β -lactam antibiotics and of antibiotic/ β -lactamase inhibitor combinations. *Biochemical Pharmacology*, **71**: 930-940.

Cavallo J. D., Fabre R., Jehl F., Rapp C. et Garrabé E. (2004). Bêta-lactamines. *EMC-Maladies Infectieuses*, **1**: 129-202.

Charlier . J., Coyette P., Dehareng D., Dive G., Duez C., Dusart J., Fonzé E., Fraipont C., Frère. J. M., Galleni M., Goffin C., Joris B., Lamotte-Brasseur J. et Nguyen-Distèche M. (1998). Résistance bactérienne aux β -lactamines. *Médecine/sciences*, **14**: 544-555.

Chen Y., Delmas J., Sirot J., Shoichet B. and Bonnet R. (2005). Atomic resolution structures of CTX-M β -lactamases: Extended Spectrum activities from increased mobility and decreased stability. *Journal of Molecular Biology*, **348**: 349-362.

Coleman K. (2006). Extending the life of β -lactam antibiotics: New β -lactamase inhibitors. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies*, **3** (2): 183-188.

Comite de l'antibiogramme de la société française de microbiologie. Communiqué 2007.

Corvec S., Caroff N., Espaze E., Giraudeau C., Drugeon H. and Reynaud A. (2005). AmpC cephalosporinase hyperproduction in *Acinetobacter baumannii* clinical strains. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **52**: 629-635.

Fenollar-Ferrer C., Frau J., Donoso J. and Muñoz F. (2008). Evolution of class C β -lactamases: factors influencing their hydrolysis and recognition mechanisms. *Theoretical Chemistry Accounts*, **121**: 209-218.

Dal Peraro M., Vila A. J., Carloni P. and Klein M. L. (2007). Role of zinc content on the catalytic efficiency of B1 metallo- β -lactamases. *Journal of the American Chemical Society*, **129** (10): 2808-2816.

Demain A. L. and Elander R. P. (1999). The β -lactam antibiotics: past, present, and future. *Antonie van Leeuwenhoek*, **75**: 5-19.

Eftekhar. F. and Rafice R. (2006). An overlay gel method for identification and isolation of bacterial β -lactamases. *Journal of Microbiologie Methods*, **64**: 132-134.

El-Shaboury S. R., Saleh G.A., Mohamed F.A and Rageh A. H. (2007). Analysis of cephalosporin antibiotics. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **45**: 1-19.

Essack S. Y. (2001). The development of β -lactam Antibiotics in Response to the evolution of β -lactamases. *Pharmaceutical Research*, **18** (10): 1391-1399.

Fisher J. F., Meroueh S. O. and Mobashery S. (2005). Bacterial resistance to β -lactam antibiotics: compelling opportunism, compelling opportunity. *Chemical Reviews*, **105**: 395-424.

Frère J.M. (1995). β - lactamases and bacterial resistance to antibiotics. *Molecular Microbiology*, **16** (3): 385-395.

Fujii T., Sato K., Miyata K., Inoue M. and Mitsuhashi S.(1986).Biochemical properties of β -lactamase produced by *Legionella gormanii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **29** (5): 925-926.

Fukagawa Y., Takei T. and Ishikura T. (1980). Inhibition of β -lactamase of *Bacillus licheniformis* 749/C by compound PS-5, a new β -lactam. *Biochemical Journal*, **185**: 177-188.

Galleni M., Lamotte-Brasseur J., Rossolini G.M., Spencer J., Dideberg O., frère J.M. and the metallo- β -lactamase working group. (2001). Standard numbering scheme for class B β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **45** (3): 660-663.

Garau G., García-Sáez I., Bebrone C., Anne C., Mercuri P., Galleni M., Frère J. M. and Dideberg O. (2004). Update of the standard numbering scheme for class β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **48** (7): 2347-2349.

Gaudy C. et Buxeraud J. (2005). Antibiotiques: pharmacologie et thérapeutique. Ed. Collection PHARMA. pp 35, 65, Paris, France.

Gazengel, J.M. (2001). Le préparateur en pharmacie. éd. Tec et Doc, Paris, pp. 18-23.

Ghuysen J. M. 1994. Molecular structures of penicillin-binding proteins **and** β -lactamases. *Trends Microbiology*, **842**: 372-380.

Hawkey P.M.(2000). Mechanisms of resistance to antibiotics. *Journal of Intensive Care Medicine*, **26**: S9-S13.

Hall B. G. and Barlow M. (2003). Structure-Based Phylogenies of the Serine β -lactamases. *Journal of Molecular Evolution*, **57**: 255-260.

Hata M., Fujii Y., Tanaka Y., Ishikawa H., Ishii M., Neya S., Tsuda M. and Hoshino T. (2006). Substrate deacylation mechanisms of serine β -lactamases. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **29** (11): 2151-2159 .

Heritage J., M'Zali F. H., Gascoyne-Binzi D. and Hawkey P. M. (1999). Evolution and spread of SHV extended-spectrum β -lactamases in gram-negative bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **44**: 309-318.

Héritier C., Poirel L., Fournier P.E., Claverie J.M., Raoult D. and Nordmann P. (2005). Characterization of the naturally occurring oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **49** (10): 4174-4179.

Hikida M., Yoshida M., Mitsuhashi S. and Indue M. (1988). Purification and properties of a cephalosporinase from *Cinetobacter calcoaceticus* . *Journal of Antibiotics*, **XLII** (1): 123-126.

Hirai. K., Iyobe S., Inoue M., and Mitsuhashi S. (1980). Purification and properties of a New β -lactamase from *Pseudomonas cepacia*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **17** (3): 355-358.

Hujer K. M., Hamza N. S., Hujer A. M., Perez ., Helfand M. S., Bethel C. R., Thomson J. M., Anderson V. E., Barlow M., Rice L. B., Tenover F. C., and Bonomo R. A. (2005). Identification of a new allelic variant of the *Acinetobacter baumannii* cephalosporinase, ADC-7 β -lactamase: defining a unique family of class C enzymes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **49** (7): 2941-2948.

Jacoby G. A. (2006). β -lactamase Nomenclature. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **50** (4): 1123-1129.

Jacoby G. M. and Medeiros A. A. (1991). More extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **35** (9): 1697-1704.

Jacoby G. A. and Munoz-Price L. S. (2005). The new β -lactamases. *The New England Journal of Medicine*, **352**: 380-391.

Jarlier V., Nicolas M. H., Fournier G. and Philippon A. (1988). Extended-broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in

Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Infectious Diseases*, **10**: 867-878.

Jeong S. H., Bae I. K., Park K. O., Jun An Y., Sohn S. G., Ju Jang S., Sung K. H., Yang K. S., Lee K., Young D. and Lee S. H. (2006). Outbreaks of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing carbapenemases in Korea. *Journal of Microbiology*, **44** (4): 423-431.

Koeleman J. G. M., Stoof J., Van Der Bijl M. W., Vandenbroucke-Grauls C.M. J. E., and Savelkoul P. H. M. (2001). Identification of epidemic strains of *Acinetobacter baumannii* by integrase gene PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, **39** (1): 8-13.

Knox J. R. (1995). Extended-spectrum and inhibitor-resistant TEM-Type β -lactamases: Mutations, specificity and three-dimensional structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **39** (12): 2593-2601.

Lamotte-Brasseur J., Dive G., Dideberg O., Charlier P., Frère J.M. and Ghuysen J.M. (1991). Mechanism of acyl transfer by the class A serine β -lactamase of *Streptomyces albus*. *Biochemical Journal*. **279**: 213-221.

Laraki N., Franceschini N., Rossolini G.M., Santucci P., Meunier C., De pauw E., Amicosante G., Frère J.M. and Galleni M. (1999). Biochemical Characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* 101/1477 Metallo- β -lactamase IMP-1 Produced by *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, **43** (4): 902- 906.

Lavigne J.P., Sotto A., Merle C., Jourdan J., Soussy C. J. et Sirot D. (2002). Résistance enzymatique d'*Escherichia coli* aux β -lactamines et prévalence en clinique. *Pathology and Biology*. **50**: 388- 93.

Lechschmidpfe B., Orneleit T. and Kleber H.P. (1992). Purification and characterization of an extracellular β -lactamase produced by *Acinetobacter calcoaceticus*. *Journal of General Microbiology*, **138**: 1197-1202.

Liras P. and Rodriguez-Garcia A. (2000). Clavulanic acid, a β -lactamase inhibitor: biosynthesis and molecular genetics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **54**: 467-475.

Livermore D. M. (1995). β -Lactamases in laboratory and Clinical Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, **8** (4): 557- 584.

Livermore D.M. (1998). β -lactamase-mediated resistance and opportunities for its control. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **41**Suppl. D: 25-41.

Livermore D. M and Derek F.J.B. (2001). Detection of β -lactamase-mediated resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **48**(suppl. S1) : 59-64.

Livermore D. M. and Woodford N. (2006). The β -lactamase threat in Enterobacteriaceae, Pseudomonas and Acinetobacter. *TRENDS in Microbiology*, **14** (9): 413-420.

Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. and Randall R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*.

Maiti S. N., Kamalesh Babu R. P. and Shan R. (2006). Overcoming bacterial resistance: role of β -lactamase inhibitors. *Top Heterocyclic Chemistry*, **2**: 207-246.

Majiduddin. F. K., Materon I. C. and Palzkill T. G. (2002). Molecular analysis of beta-lactamase structure and fonction . *International Journal of Medical Microbiology*, **292**: 127-137.

Matagne A., Dubus A., Galleni M. and Frère J. M. (1999). The β -lactamase cycle: a tale of selective pressure and bacterial ingenuity. *Natural Product Reports*, **16**:1-19.

Mantagne A. and Frère J. M. (1995). Contribution of mutant analysis to the understanding of enzyme catalysis: the case of class A β -lactamases. *Biochemica et . Biophysica Acta*, **1246** (2): 109-127.

Matagne A., Lamotte-Brasseur J. and Frère J.M. (1998). Catalytic properties of class A β -lactamases : efficiency and diversity. *Biochemical Journal*, **330** : 581-598.

Matagne A., Misselyn-Bauduin A. M., Joris B., Ercicum T., Granier B. and Frère J. M. (1990).The diversity of the catalytic properties of class A β -lactamases. *Biochemical Journal*, **265**: 131-146.

Massova I. and Mobashery S. (1998). Kinship and diversification of bacterial Penicillin-Binding Proteins and β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **42** (1): 1-17.

Minami S., Yotsuji A., Inoue M. and Mitsuhashi S. (1980). Induction of β -Lactamase by Various β -Lactam Antibiotics in *Enterobacter cloacae*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, **18** (3): 382-385.

- Moulin M. et Coquerel A.** (2002). Pharmacologie . 2^{ème} éd. Masson, Paris. pp. 163-191.
- Page M. I. and Badarau A.** (2008). The Mechanisms of catalysis by metallo β -lactamases. Bioinorganic Chemistry and Applications, doi:10.1155/2008/576297.14 P.
- Palzkill T. and Botstein D.** (1992). Identification of amino acid substitutions that alter the substrate specificity of TEM-1 β -lactamase. Journal of Bacteriology, **174** (16): 5237-5243.
- Park Y. J., Park S.Y., Oh E. J., Park J.J., Lee K.Y., Woo G.J. and Lee K.** (2005). Occurrence of extended-spectrum h-lactamases among chromosomal AmpC-producing *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, and *Serratia marcescens* in Korea and investigation of screening criteria. Diagnostic Microbiology and Infectious, **51**: 265-269.
- Patrick G.L.** (2003). Chimie pharmaceutique . 1^{ère} éd. de boeck, Paris, p.403.
- Perilli M., Felici A., Oratore A., Cornaglia G., Bonfiglio G., Rossolini G. M., and Amicosante G.** (1996). Characterization of the Chromosomal Cephalosporinases Produced by *Acinetobacter lwoffii* and *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, **40** (3): 715-719.
- Petersson A. C., Eliasson I., Kamme C. and Mjörner H.** (1989). Evaluation of four qualitative methods for detection of β -lactamase production in *Staphylococcus* and *Micrococcus* Species . European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases, **8** (11) : 962-967.
- Philippon A., Arlet G. and Jacoby G. A.** (2002). Plasmid-Determined AmpC-Type β -lactamases. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, **46** (1): 1-11.
- Poirel L., Corvec S., Rapoport M., Mugnier P., Petroni A., Pasteran F., Faccione D., Galas M. and Drugeon H., Cattoir V. and Nordmann P.** (2007). Identification of the novel narrow-spectrum β - lactamase SCO-1 in *Acinetobacter* spp. from Argentina. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, **51** (6): 2179-2184.
- Poirel L. Naas T. Guibert M., EL Chaibi B., Labia R. and Nordmannp.** (1999). Molecular and Biochemical Characterization of VEB-1, a Novel Class A Extended-Spectrum β -Lactamase Encoded by an *Escherichia coli* Integron Gene. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, **43**: 573-581.

- Poirel L. and Nordmann P.** (2006). Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin Microbiol Infect.* **12**: 826-836.
- Poirel L. and Nordmann P.** (2008). *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms of Resistance, Multiple β -Lactamases in *Acinetobacter* Biology and Pathogenesis. Ed. Springer. Italy.
- Poole K.** (2004). Resistance to β -lactam antibiotics. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **61**: 2200-2223.
- Philippon A., Arlet G. and Jacoby G. A.** (2002). Plasmid-Determined AmpC-Type β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **46** (1): 1-11.
- Philippon A., Dusart J., Joris B. and Frère J. M.,** (1998) .The diversity, structure and regulation of β -lactamases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **54**: 341-346.
- Poirel L. Naas T. Guibert M., EL Chaibi B., Labia R. and Nordmann p.** (1999). Molecular and Biochemical Characterization of VEB-1, a Novel Class A Extended-Spectrum β -Lactamase Encoded by an *Escherichia coli* Integron Gene. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, **43**: 573–581.
- Rasmussen B. A. and Bush K.** (1997). Carbapenem-hydrolyzing β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **41** (2): 223-232.
- Reading C. and M. Cole.** (1977). Clavulanic Acid: a β -Lactamase-Inhibiting β -Lactam from *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy*, **11**: 852-857.
- Rodriguez-Villalobos H. et Struelens M. J.** (2006). Résistance bactérienne par β -lactamases à spectre étendu : implications pour le réanimateur . *Réanimation*, **15**: 205-213.
- Samaha-Kfoury J . N. and Araj G. F.** (2003). Recent developments in β - lactamases and extended spectrum β -lactamases. *Clinical review*, **327**: 1209-1213.
- Seifert H., Baginski R., Schulze A. and Pulverer G.**(1993). Antimicrobial Susceptibility of *Acinetobacter* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **37** (28): 750-753.
- Simpson I. N., Harper P. B. and O'callaghan C. H.** (1980). Principal β -lactamases Responsible for Resistance to β -Lactam Antibiotics in Urinary Tract Infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **17** (6): 929-936.

- Thomson K. S., Weber D. A., Sanders C. C. and Sanders W. E. JR.** (1990). β -lactamase production in members of the family Enterobacteriaceae and resistance to β -lactam-Enzyme inhibitor combinations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **34** (4): 622-627.
- Then R. L. and Angehrn P.** (1982). Trapping of nonhydrolyzable cephalosporins by cephalosporinases in *Enterobacter cloacae* and *Pseudomonas aeruginosa* as a possible resistance mechanism. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **21** (5): 711-717.
- Therrien C. and Levesque R. C.** (2000). Molecular basis of antibiotic resistance and β -lactamase inhibition by mechanism-based inactivators: perspectives and future directions. *FEMS Microbiology Reviews*, **24**: 251- 262.
- Walker J.M.**(2002). The protein protocols. 2^{ème} Ed. Ed Humana Press.
- Walsh T. R., Toleman M. A., Poirel L. and Nordmann P.** (2005). Metallo- β -Lactamases: the quiet before the Storm?. *Clinical Microbiology Reviews*, **18** (2): 306-325.
- Walsh C.T. and Wright G.** (2005). Introduction: Antibiotic Resistance. *Chemical Reviews*, **105** (2): 391-393.
- Walther-Rasmussen J. and Højby N.** (2006). OXA-type carbapenemases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **57**: 373-383.
- Wieczorek P., Sacha P., Hauschild T., Zórawski M., Krawczyk M. and Tryniszewska E.** (2008). Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* the role of AdeABC (RND family) efflux pump in resistance to antibiotics. *Folia histochemica et Cytobiologica*, **46** (3): 257-267.
- Williams J.D.** (1999). β -lactamases and β -lactamase inhibitors. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 12 Suppl,1: S3–S7.
- Wilke M. S., Lovering A. L. and Strynadka N. CJ.** (2005). β -lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Current Opinion in Microbiology*, **8**: 525-533.
- Wright. G. D.** (2005). Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **57**: 1451-1470.
- Zeba B.** (2005). Overview of β -lactamase incidence on bacterial drug Resistance. *Academic Journals*, **4** (13): 1559-1562.

Zhou H., Pi B. R., Yang Q., Yu Y. S., Chen Y. G., Li L. J. and Zheng S. S. (2007). Dissemination of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains carrying the ISAbal–blaOXA-23 genes in a chinese hospital. *Journal of Medical Microbiology*, **56**: 1076-1080.

Annexes

Annexe I

Tableau I : Acides aminés et leurs symboles.

| Acides aminés | Symbole |
|---------------|---------|
| Alanine | A |
| Cystéine | C |
| Aspartate | D |
| Glutamate | E |
| Phénylalanine | F |
| Glycocolle | G |
| Histidine | H |
| Isoleuine | I |
| Lysine | K |
| Leucine | L |
| Méthionine | M |
| Asparagine | N |
| Proline | P |
| Glutamine | Q |
| Arginine | R |
| Sérine | S |
| Thréonine | T |
| Valine | V |
| Tryptophane | W |
| Tyrosine | Y |

Annexe II

- **Préparation des solutions pour le dosage des protéines :**
 - Solution (A) : 5% Na₂CO₃;
 - Solution (B) : 0,5% CuSO₄ · 5H₂O in 1% de sodium potassium tartrate ;
 - Solution (C): 50ml (A) + 2ml (B) (à préparer immédiatement) ;
 - Solution (D): NaOH(1N) ;
 - Solution (E): Folin - Ciocalteu dilué à 1/2 .
- Préparation de la BSA une nuit avant le dosage à une concentration de 200µg/ml
- Préparation des dilutions selon le tableau II

Tableau II : Solution de BSA.

| Concentration | 0 | 25 | 50 | 75 | 100 | 150 | 200 |
|---------------|----|------|-----|------|-----|-----|-----|
| V(SM) | 0 | 1,25 | 2,5 | 3,75 | 5 | 7,5 | 10 |
| V(eau) | 10 | 8,75 | 7,5 | 6,25 | 5 | 2,5 | 0 |

- **Méthode du calcul de vitesse d'hydrolyse**

Selon la loi de Burlenberg : $\Delta A = \epsilon \Delta C l$

$$\text{Donc : } \Delta C = \Delta A / \epsilon l$$

Selon les courbes tracées l'allure des courbes est droite entre le temps 0 et 2 minutes

$$\text{Donc } V = \Delta C / \Delta t$$

sachant que :

$$\Delta t = t_2 - t_0 \text{ dans le cas } \Delta \epsilon < 0$$

et

$$\Delta t = t_0 - t_2 \text{ dans le cas } \Delta \epsilon > 0$$

Annexe III

- **Préparation des produits d'électrophorèse**

- Solution Stock acrylamide : 30g acrylamide et 0,8g bis acrylamide dans 100ml d'eau distillée puis filtrer ;
- Tampon du gel de séparation : 1,5M tris HCl , pH 8,8 ;
- Tampon du gel de concentration : 0,5M tris HCl, pH 6,8 ;
- Persulfate d'ammonium à 10% ;
- *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine(TEMED);
- Tampon échantillon(5X):
 - 3,1ml de tris HCl à 1M , pH 6,8
 - 0,5ml de la solution de bleu de bromophenol
 - 1,4ml de l'eau distillée
 - 5ml de glycerol.
 - Tampon de migration : dissoudre 3g de tris HCl et 14,4g de glycine puis ajuster jusqu'à 1L, le pH final est de 8,14.
 - Solution de coloration : 0,25g de bleu de coomassie R250, 125ml méthanol , 25ml d'acide acétique glacial, et 100ml d'eau distillée.
 - Solution de décoloration : 100ml méthanol , 100ml d'acide acétique glacial, et 800ml d'eau .

Annexe IV

- Courbes d'étalonnage

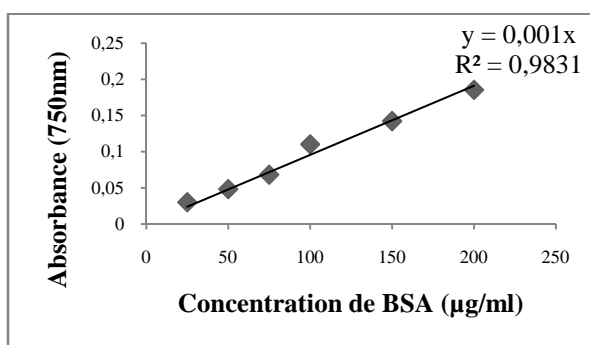


Figure 1 : Courbe d'étalonnage de la BSA

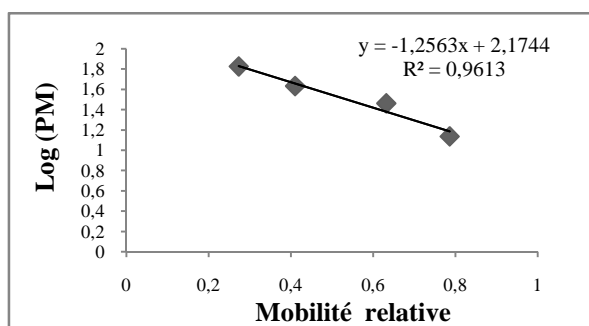


Figure 2 : Mobilité électrophorétique en fonction de PM.

Mobilité relative = distance parcourue par les protéines / distance du front de migration

Annexe V

- Vitesses d'hydrolyse de substrats hydrolysés

Tableau III : Vitesses d'hydrolyse de la pénicilline G à différentes concentrations à 235 nm.

| Concentration µM | Vitesses (µmol/L/min) |
|------------------|-----------------------|
| 100 | 20,3 ± 0,3 |
| 200 | 32,9 ± 1,9 |
| 300 | 23,9 ± 2,6 |
| 400 | 24,2 ± 0,3 |
| 500 | 31 ± 3,2 |
| 600 | 36,8 ± 0,0 |
| 700 | 36,1 ± 0,6 |
| 800 | 36,1 ± 2,6 |
| 900 | 35,2 ± 0,0 |
| 1000 | 33,5 ± 1,3 |

Tableau IV : Vitesses d'hydrolyse de la ticarcilline à différentes concentrations à 235 nm.

| Concentration μM | Vitesses ($\mu\text{mol/L /min}$) |
|-----------------------------|-------------------------------------|
| 40 | $7,9 \pm 4,9$ |
| 60 | $17,0 \pm 1,9$ |
| 80 | $19,3 \pm 1,1$ |
| 100 | $19,3 \pm 3,4$ |
| 200 | $20,8 \pm 6,4$ |
| 300 | $17,8 \pm 10,2$ |
| 400 | $15,1 \pm 0$ |

Tableau V: Vitesses d'hydrolyse de la piperacilline à différentes concentrations à 235 nm.

| Concentration μM | Vitesses ($\mu\text{mol/L /min}$) |
|-----------------------------|-------------------------------------|
| 10 | $4 \pm 2,1$ |
| 20 | $9,7 \pm 2,4$ |
| 40 | $6,1 \pm 6,1$ |
| 60 | $9,7 \pm 9,7$ |
| 80 | $5,8 \pm 5,8$ |
| 100 | $4,3 \pm 4,3$ |
| 200 | $6,4 \pm 6,4$ |

Tableau VI: Vitesses d'hydrolyse de la céfazoline à différentes concentrations à 263 nm.

| Concentration μM | Vitesses ($\mu\text{mol/L /min}$) |
|-----------------------------|-------------------------------------|
| 10 | $24 \pm 0,03$ |
| 20 | $50,9 \pm 6,1$ |
| 40 | $99,2 \pm 2,6$ |
| 60 | $156,6 \pm 0,3$ |
| 80 | $205,6 \pm 1,9$ |
| 100 | $266,2 \pm 1$ |

Annexe VI

Composition de milieux de culture

- **Gélose Mueller Hinton**
- Extrait de viande 2 g
- Hydrolysate acide de caséine 17,5 g
- Amidon 1,5 g
- Agar 10 g
- pH 7,4
- **Boillon nutritif**
- Peptone 10 g
- Extrait de viande 5 g
- Eventuellement NaCl 5 g
- pH 7,2

Résumé

Les β -lactamases représentent le mécanisme le plus utilisé par les bactéries à Gram négatif, pour contrecarrer l'action des β -lactamines. *Acinetobacter baumannii* étudiée résiste au céfotaxime, céftazidime, ceftiprome et céfépime et elle ne produit pas de BLSE. L'extrait enzymatique utilisé hydrolyse la pénicilline G, la ticarcilline, la piperacilline et la céfazoline où la céfazoline et la pénicilline G sont les plus hydrolysées. L'aztréonam, l'oxacilline, la céfoxitine, la céfotaxime, la ceftriaxone, la céftazidime et le ceftiprome ne sont pas hydrolysés. La souche étudiée peut utiliser d'autres mécanismes de résistance tels que les pompes à efflux et la modification de la cible. Le tazobactam et l'acide clavulanique inhibent les β -lactamases de l'extrait enzymatique ce qui indique que la souche produit des β -lactamases de groupe 2 de la classification de Bush et al. La cloxacilline et l'aztréonam inhibent les enzymes de l'extrait enzymatique cela nous permet de suggérer que la souche étudiée peut produire une céphalosporinase de groupe fonctionnel 1. La comparaison des résultats obtenus en utilisant les inhibiteurs a permis d'établir le profil de substrat et d'inhibition des enzymes produites par *Acinetobacter baumannii* qui sont: la céphalosporinase appartenant au groupe 1, correspondant à la classe moléculaire C et la pénicillinase probablement de groupe 2b correspondant à la classe A. Le profil électrophorétique a montré que les poids moléculaires des enzymes sont de 67 kDa pour la céphalosporinase et de 44,5 kDa pour la pénicillinase.

Mots clés: *Acinetobacter baumannii*, β -lactamases, β -lactamines, céphalosporinase, pénicillinase.

Summary

β -lactamases represent the mechanism more used by the Gram- bacteria to stop the action of the β - lactamines. *Acinetobacter baumannii* studied resists to the céfotaxime, ceftazidime, ceftiprome and céfépime and it do not produce BLSE. The enzymatic extract used in this study hydrolysis penicillin G, ticarcilline, piperacilline and céfazoline which are of the family of penicillin or cephalosporin. Aztreonam, oxacillin, cefoxitine, cefotaxime, ceftriaxone, ceftazidime and ceftiprome are not hydrolyzed. The studied strain can use other mechanisms of resistance such as pumps with efflux and modification of the target. Tazobactam and clavulanic acid inhibit the β -lactamases of the enzymatic extract what indicates that the studied strain produced β - lactamases of functional group 2. Cloxacilline and aztreonam inhibit the enzymes of the enzymatic extract that enables us to suggest that the studied strain can produce a cephalosporinase of foctionnel group 1. The comparison of the results obtained by using inhibitors makes it possible to make the profile of substrate and inhibition of the enzymes produced by *Acinetobacter baumannii* which are: A céphalosporinase pertaining to group 1, corresponding to the molecular class C and A penicillinase probably of 2b group. Electrophoretic profile showed that the molecular weights of β -lactamses enzymes are of 67kDa for céphalosporinase and 44,5 kDa for the penicillinase.

Key words: *Acinetobacter baumannii*, β -lactamases, β -lactamines, cephalosporinase, penicillinase.

ملخص

تمثل β -لاكتامزات الميكانيزم الأكثر استعمالاً من طرف البكتريا السلبية الغرام، لإيقاف فعالية β -لاكتامينات. البكتريا المدروسة مقاومة لسيفوتاكسيم، سيفتازديم، سيفبيروم و سيفبييم. كما أنها لا تنتج β -لاكتامزات ذوات المجال الواسع، المستخلص الإنزيمي المستعمل في هذه الدراسة يهدم البنيسيلين، تيكارسيلين، بيبيراسيلين. على عكس از تريونام، او كساسيلين، سيفوكستين، سيفوتاكسيم، سيفترياكسون، سيفتازديم و سيفبيروم لم يتعرضوا للهدم. كما أن هذه البكتريا يمكن أن تقاوم مستعملة ميكانيزمات أخرى مثل: المضخات و تغيير الموقع المستهدف. التازوبكتام و الكلفولانات تثبط إنزيمات هذه البكتريا هذا ما يبين إن هذه الأخيرة تنتج β -لاكتامزات التي تنتمي إلى الفوج 2 من تقسيم بوش و مساعدتها. الكلوكساسيلين و الاز تريونام تثبط هذه الإنزيمات مما يبين أن هذه البكتريا يمكن أن تنتج β -لاكتامزات من الفوج 1. مقارنة نتائج التثبيط المحصل عليها، سمح لنا باستنتاج نوعية الإنزيمات المنتجة من طرف هذه البكتريا: سيفالوسبوريناز التي تنتمي إلى الفوج 1 و البنيسيليناز التي تنتمي إلى الفوج 2 و الكتلة الجزيئية لهذه الإنزيمات هي على التوالي: 67 و 44,5 كيلودالتون.

الكلمات المفتاح: β -لاكتامزات، β -لاكتامينات، سيفالوسبوريناز، البنيسيليناز.