

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE FARHAT ABBAS –SETIF-
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

MEMOIRE

Présenté par

BOUSSOUALIM NAOUEL

En vue d'obtenir le Diplôme de

MAGISTER

Spécialité : Microbiologie

Option : Microbiologie Appliquée

**Caractérisation biochimique d'une
 β -lactamase isolée d'une souche d'*E. coli*
résistante à l'acide clavulanique. Etude des
activités de certains flavonoïdes.**

Soutenu le :

devant le jury d'examen

Président :

Pr. Nabil NANCIB

Université de Sétif

Encadreur :

Pr. Djalal MEZIANE-CHERIF

Université de Sétif

Examineur :

Pr. Saïd BENALLAOUA

Université de Béjaïa

Examineur :

Dr. Seddik KHENNOUF

Université de Sétif

REMERCIEMENTS

J'adresse mes remerciements les plus sincères à mon encadreur Pr. D. MEZIANE-CHERIF qui a guidé, surveillé le déroulement et l'exécution du travail de ce mémoire en me prodiguant tout aide possible, et en me consacrant beaucoup de son temps précieux.

Ma vive reconnaissance va au Pr. N. NANCIB professeur à l'université de Sétif d'avoir accepté de présider le jury de soutenance du mémoire, ainsi qu'aux Pr. S. BENALLAOUA de l'université de Béjaïa et Dr. S. KHENNOUF de l'université de Sétif d'avoir accepté de juger ce modeste travail.

Je présente ici le témoignage de ma sincère gratitude pour leur aide aux enseignants, Dr. H. BOURICHE, Dr. A. BAGHIANI, Dr. L. ARRAR, Pr. K. GHARZOULI et Dr. H. HARZALLAH.

RESUME

L'étude phénotypique de la souche clinique *E. coli* K18 isolée du centre hospitalo-universitaire de Sétif, a montré qu'elle est résistante aux pénicillines et à la combinaison amoxicilline-acide clavulanique. Elle reste cependant sensible à la combinaison pipéracilline-tazobactam, aux céphalosporines de 3^{ème} génération et au méropénème.

Afin d'étudier le mécanisme de résistance, une β -lactamase a été isolée par chromatographie échangeuse d'ion sur une résine Mono-Q. Cette technique qui a permis d'obtenir un rendement de 56% et un facteur de purification global de 5,9. La caractérisation biochimique montre que la β -lactame de la souche d'*E. coli* K18 a un poids moléculaire de 24 KDa et un pI de 5,2. Elle est résistante à l'acide clavulanique, insensible à l'EDTA et au NaCl. L'acide clavulanique et le tazobactam l'inhibent de manière compétitive avec des K_I et des IC_{50} qui dépassent largement les valeurs de TEM-1. C'est une pénicillinase avec un V_{max}/K_M de 0,91. Par conséquent et selon la classification d'Ambler, cette enzyme fait partie de la classe A. La résistance est probablement due à l'émergence d'un mutant de β -lactamase de type TEM désigné par TEM résistante aux inhibiteurs (TRI).

Treize (13) molécules de flavonoïdes différentes, 3 polyphénols (acide caféique, acide ellagique et acide gallique) sont testés pour leur capacité à inhiber la β -lactamase. Les flavonoïdes ont une fonction 4-oxo semblable à celle de l'acide clavulanique. Le type d'inhibition et la constante d'inhibition (K_I) sont déterminés et une étude de relation structure-activité est établie. Parmi les molécules testées, la fisétine, la flavone, la quercétine, la catéchine et la gossypine sont des inhibiteurs incompétitifs. La myricétine, la quercitrine, la naringénine, la morine, la kaempférol et la rutine sont des inhibiteurs non compétitifs. La diosmine, l'apigénine et les polyphénols ne présentent aucun effet inhibiteur. Les constantes d'inhibition (K_I) sont pour la plupart des molécules supérieures à 100 μ M, c'est-à-dire 200 fois moins efficaces que l'acide clavulanique ($K_I = 0,5 \mu$ M). Il semble que le type de cycle et la position du OH dans les structures des molécules ont une importance majeure. En conclusion, les molécules testées ont un faible pouvoir inhibiteur et la découverte d'une bonne molécule candidate passe inévitablement par l'évaluation d'un plus grand nombre de produits.

Mots clés : β -lactamase, *E. coli*, β -lactame, acide clavulanique, flavonoïdes.

SUMMARY

The phenotypic study of the clinical strain *E. coli* K18 isolated from the hospital of Setif, has shown that it is resistant to penicillin and amoxicillin-clavulanate but susceptible to the combination piperacillin-tazobactam, the 3rd generation cephalosporins and meropenem.

To study resistance mechanism, a β -lactamase was isolated by ion-exchange chromatography on a resin Mono-Q with a yield of 56% and a purification factor equal of 5,9. The biochemical characterization showed that the β -lactamase of the strain *E. coli* K18 has a molecular weight of 24 KDa and a *pI* of 5.2. It is resistant to clavulanic acid, insensitive to EDTA and NaCl. Clavulanic acid, tazobactam and sulbactam are competitive inhibitors with K_I and IC_{50} far beyond the values of those TEM-1. It is a penicillinase with a V_{max} / K_m of 0,91. Therefore, according to the Ambler classification, this enzyme is part of Class A. Resistance is probably due to the emergence of a mutant of β -lactamase type TEM designated by TEM resistente to inhibitors (TRI).

Thirteen molecules of different flavonoïds, three polyphenols (cafeic acid, ellagic acid and gallic acid) are tested for their ability to inhibit β -lactamase. Flavonoïds have a 4-oxo function similar to clavulanic acid. The type of inhibition and the inhibition constant (K_I) are determined and a study of structure-activity relationship was established. Among the molecules tested, fisetin, flavone, quercetin, catechin and gossypin are uncompetitive inhibitors. The myricetin, quercitrin, naringenin, morin, kaempferol and rutin are noncompetitive inhibitors. Apigenin, diosmin and polyphenols have no inhibitory effect. The inhibition constants (K_I) of the most flavonoïds tested are above 100 μ M, which are 200 fold less effective than clavulanic acid ($K_I = 0,5$ M). The importance of the position of OH in the structures of molecules has a major importance.

Key words: β -lactamase, *E. coli*, β -lactam, clavulanic acid, flavonoïds.

الملخص

بينت دراسة النمط الظاهري للعزلة السريرية *E.coli* K18 المتحصل عليها من المستشفى الجامعي بسطيف أن هذه البكتيريا مقاومة للبنيسيلين والمتلازمة أموكسيسيلين-حمض Clavulanic وحساسة لـ Pipracillin-Tazobactam و لسفالوسبورينات الجيل الثالث و Meropenem.

استهدفت هذه الدراسة تنقية إنزيم β -lactamase عن طريق كروماتوغرافيا التبادل الأيوني على هلام mono-Q، التي قدر مردود استخلاصه بـ 56% و معامل نقاوته بـ 5.9%. أظهرت الدراسة البيوكيميائية لإنزيم β -lactamase أنه ذو وزن جزيئي 24 كيلودالتون وذو نقطة تعادل كهربائي (PI = 5.2)، وهو مقاوم لحمض Clavulanic وغير حساس لـ EDTA و NaCl. يثبط حمض Clavulanic، Sulbactam و Tazobactam تنافسيا بواسطة ذات k_I و IC_{50} ، التي تتجاوز بكثير قيم TEM-1. مميها بامياز للبنيسيلانات ($V_{max}/K_m=0.9$). واعتمادا على تصنيف Ambler له، فقد تم إدراجه ضمن عناصر المجموعة A. يحتمل أن المقاومة ناتجة عن طفرة مخفية لإنزيم β -lactamase نوع TEM المتميز بواسطة مقاومتها للمثبطات (TRI).

كما تم اختبار قدرة 14 مركب فلافونويدي مختلف: 3 منها عديدات الفينول: حمض Gallic، حمض Ellagic، حمض Cafeic على تثبيط نشاط إنزيم β -lactamase. إذ تمتلك الفلافونويدات وظيفة 4-oxo مشابهة لتلك لحمض Clavulanic. تم تحديد نوع التثبيط وثابت التثبيط (K_I) كما تمت دراسة العلاقة بين البنية و الوظيفة. من بين الجزيئات المدروسة وجد أن fisetin، flavone، quercetin، catechin، gossypin، myricetin، quercitrin naringenin، rutin، kaempferol، morin تثبطها تثبيطا لاتنافسي. بينما كل من Diosmin، Apegenin، حمض cafeic حمض ellagic، حمض gallic لا يبدي تأثير. لوحظ أن ثابت التثبيط K_I لمعظم هذه الجزيئات أكبر من $100 \mu m$ أي 200 مرة أقل فاعلية من حمض clavulanic ($k_I = 0.5 \mu m$). يبدو أن القدرة التثبيطية للفلافونويدات تعود إلى نوع الحلقة ووجود وتوزع مجاميع هيدروكسيل (OH) التي تمتلك أهمية كبيرة. ختاماً الجزيئات المدروسة لها معامل تثبيط ضعيف و اكتشاف جزيئية أكثر فعالية تمر لا محالة بدراسة عدد كبير من الجزيئات.

الكلمات المفاتيح: β -lactamase، *E. coli*، حمض clavulanic، الفلافونويدات.

LISTE DES ABBREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
AMP	Adénosine monophosphate
ATP	Adénosine triphosphate
CMI	Concentration minimale inhibitrice
EDTA	Acide éthylène diamine tetracétique
IC₅₀	Concentration inhibitrice à 50%
IMP	β -lactamase active sur l'imipenem
KDa	Kilodalton
K_I	Constante d'inhibition
K_M	Constante de Michaelis
OXA	oxacillinase
P99	β -lactamase d' <i>Enterobacter cloacae</i> souche P99
PCR	Réaction en Chaîne par Polymérase
PM	Poids moléculaire
SD	Standard deviation
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulphate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SEM	Erreur standard de la moyenne
SHV	Sulphydryl reagent variable
TEM	Nommé d'après le patient (Temoneira) qui a fournit le premier échantillon.
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl éthylène diamine
TRI	TEM résistante aux inhibiteurs
UV/Vis	Ultraviolet/Visible
V_{max}	Vitesse maximale

SOMMAIRE

Introduction générale.....	1
1 Généralités.....	4
1.1 <i>Résistance bactérienne aux antibiotiques.....</i>	5
1.1.1 Résistance naturelle.....	5
1.1.2 Résistance acquise.....	5
1.1.3 Mécanisme biochimique.....	6
1.2 <i>Les β-lactamines.....</i>	7
1.2.1 Généralités.....	7
1.3 <i>Les β-lactamases.....</i>	10
1.3.1.1 Classification d'Amblar.....	12
1.3.1.2 Classification de Bush, Jacoby et Medeiros.....	13
1.3.2 Structure et fonction des β -lactamases.....	14
1.3.2.1 β -lactamases à sérine active.....	14
1.3.2.2 Les métallo-enzymes.....	16
1.3.3 Mécanisme catalytique.....	17
1.4 <i>Les inhibiteurs.....</i>	18
1.4.1 Caractéristiques structurales et fonctionnelles.....	19
1.4.1.1 Acide clavulanique.....	19
1.4.1.2 Sulbactam.....	19
1.4.1.3 Tazobactam.....	20
1.4.2 Mécanisme d'inhibition : cas de l'acide clavulanique.....	20
1.4.3 Résistance aux inhibiteurs.....	22
1.5 <i>Les flavonoïdes.....</i>	24
1.5.1 Structure et classification.....	24
1.5.2 Activités biologiques des flavonoïdes.....	26
1.5.2.1 Effets antioxydants.....	26
1.5.2.2 Effet antiallergique.....	26
1.5.2.3 Effets anti-inflammatoires.....	27
1.5.2.4 Effets anti-ulcéreux.....	27
1.5.2.5 Effets anticancéreux.....	27
1.5.2.6 Effets antimicrobiens.....	27
2 Matériels et Méthodes.....	28
2.1 <i>Souche bactérienne.....</i>	29
2.2 <i>Produits chimiques.....</i>	29
2.3 <i>Détermination des CMI.....</i>	30
2.4 <i>Production et purification de la β-lactamase.....</i>	31

2.4.1	Culture bactérienne.....	31
2.4.2	Extraction de la β -lactamase.....	31
2.4.3	Dosage des protéines et de l'activité enzymatique	31
2.4.3.1	Dosage des protéines.....	31
2.4.3.2	Dosage de l'activité enzymatique	32
2.4.4	Purification de la β - lactamase	32
2.4.4.1	Précipitation au sulfate d'ammonium	32
2.4.4.2	Chromatographie échangeuse d'ions sur résine Mono-Q	33
2.4.4.3	Chromatographie d'affinité sur agarose greffé par l'acide meta-aminophenylboronique..	33
2.5	<i>Détermination du poids moléculaire</i>	33
2.6	<i>Détermination du point isoélectrique</i>	34
2.7	<i>Influence du pH et la température sur l'activité enzymatique</i>	35
2.8	<i>Détermination des paramètres cinétiques</i>	36
2.9	<i>Effet des inhibiteurs et d'autres substances sur l'activité enzymatique</i>	37
2.10	<i>Effet des flavonoïdes sur l'activité de la β-lactamase</i>	37
3	Résultats et discussion	39
3.1	<i>Détermination de la CMI</i>	40
3.2	<i>Détermination de l'activité spécifique de l'extrait brut</i>	41
3.3	<i>Isolement et purification du β-lactamase</i>	42
3.3.1	Essai de purification par chromatographie d'affinité.....	45
3.4	<i>Influence du pH et la température sur l'activité enzymatique</i>	47
3.5	<i>Caractérisation biochimique de la β-lactamase d'E.coli K18</i>	48
3.5.1	Poids moléculaire	48
3.5.2	Point isoélectrique	49
3.5.3	Inhibition par l'EDTA	49
3.5.4	Inhibition par NaCl.....	50
3.5.5	Détermination des paramètres cinétiques de la β -lactamase.....	50
3.5.6	Effet de l'acide clavulanique, tazobactam et sulbactam	52
3.6	<i>Evaluation de l'effet inhibiteur des flavonoïdes</i>	55
	Conclusion générale	59
	Références bibliographiques	61
	Annexes	68

Liste des illustrations

Figure. 1 : Cycle d'un anneau β -lactame et les structures du noyau de base des β -lactamines (Babic et coll., 2006).	8
Figure. 2 : Les différentes étapes de la synthèse du peptidoglycane .	9
Figure. 3 : Similarité de structure entre les antibiotiques à noyau β -lactames i la pénicilline et le substrat naturel des DD-peptidases (D-alanyl-D-alanine).	9
Figure. 4 : Mode d'action des β -lactamases à sérine. L'hydrolyse finale libère un antibiotique inactif (Livermore et coll., 1998).	10
Figure. 5 : Localisation de la β -lactamase dans les bactéries à Gram positif et à Gram négatif (Maiti et coll., 2006).	11
Figure. 6 : Structures des β -lactamases (Babic et coll., 2006).	15
Figure. 7 : Structure chimique des inhibiteurs de β -lactamases	18
Figure. 8 : Schéma du mécanisme de l'inhibition des β -lactamases par l'acide clavulanique. L'inhibition par le sulbactam et le tazobactam est similaire (Padayatti et coll., 2005).	21
Figure. 9 : Structure générale des composés polyphénoliques (Yao et coll., 2004)	24
Figure. 10 : Mesure de la CMI par méthode E-Test	30
Figure. 11 : Profil de l'absorbance à 280 nm et de l'activité spécifique de β -lactamase obtenus après chromatographie sur une colonne Mono-Q.	42
Figure. 12 : Gel d'électrophorèse des fractions éluées de la chromatographie échangeuse d'ions Mono-Q.	43
Figure. 13 : Profil de l'absorbance à 280 nm et de l'activité spécifique des différentes fractions de la chromatographie échangeuse d'ion.	44
Figure. 14 : Gel d'électrophorèse des fractions éluées de la chromatographie échangeuse d'ions sans l'étape de précipitation	45
Figure. 15 : Profil de l'absorbance à 280 nm et de l'activité spécifique des différentes fractions de la chromatographie d'affinité.	46
Figure. 16 : Effet de la température et du pH sur l'activité enzymatique de la β -lactamase d'E.coli K18.	47
Figure. 17 : Gel d'électrophorèse SDS-PAGE d'une fraction riche en β -lactamase (ligne 2) ; témoin de poids moléculaires (ligne 1) ; gel amidon-agar (ligne 3).	48
Figure. 18 : Détermination du point isoélectrique (pI) de l'extrait brut (ligne 2) ; Témoin de points isoélectrique; (ligne 1) : gel amidon-agar (ligne 3).	49
Figure. 19 : Pourcentages d'inhibition de la β -lactamase d'E. coli K18 par (a) l'acide clavulanique, (b) le tazobactam et (c) le sulbactam.	53
Figure. 20 : Structures chimiques de acide gallique (a), acide ellagique (b) et l'acide caféïque (c).	58

Liste des Tableaux

Tableau. 1 :	<i>Classification moléculaire et phénotypique des β-lactamases (Livermore, 1995).</i>	12
Tableau. 2 :	<i>Substitutions d'acides aminés observées chez les souches productrices de β-lactamases résistantes aux inhibiteurs dérivés de TEM (TRI) (Yang et coll., 1999).</i>	23
Tableau. 3 :	<i>Structure chimique de certains flavonoïdes représentatifs de chaque classe (Heim et coll., 2002).</i>	25
Tableau. 4 :	<i>Concentrations utilisées dans les tests d'inhibitions</i>	37
Tableau. 5 :	<i>Concentrations des Flavonoïde utilisées dans les tests d'inhibitions</i>	38
Tableau. 6 :	<i>Tableau des CMI de la souche E.coli K18</i>	40
Tableau. 7 :	<i>Activités spécifiques de l'extrait brut d'E. coli K18 en présence de nitrocéfine.</i>	42
Tableau. 8 :	<i>Tableau de purification de la β-lactamase à partir de la souche d'E. coli K18.</i>	43
Tableau. 9 :	<i>Tableau de purification de la β-lactamase à partir de la souche d'E. coli K18 sans l'étape de précipitation au sulfate d'ammonium.</i>	44
Tableau. 10 :	<i>Constantes d'inhibition (K_I) et structures du borate et meta-aminophenylborate</i>	46
Tableau. 11 :	<i>Paramètres cinétiques de la β-lactamase d'E. coli K18.</i>	51
Tableau. 12 :	<i>Comparaison entre les K_M de TEM-1 et notre β-lactamase.</i>	51
Tableau. 13 :	<i>IC_{50} et K_I de la β-lactamase d'E. coli K18.</i>	52
Tableau. 14 :	<i>Comparaison des IC_{50} et K_I de différents TRI. (Chaïbi et coll., 1999)</i>	54
Tableau. 15 :	<i>Les pourcentages d'inhibition des flavonoïdes</i>	55
Tableau. 16 :	<i>Type d'inhibition et KI des flavonoïdes.</i>	57

Introduction générale

Les antibiotiques ont longtemps été considérés comme des armes parfaites qui éradiquent toute maladie infectieuse d'origine bactérienne. Toutefois, l'utilisation abusive de ces composés dans le domaine médical a eu pour conséquence l'apparition progressive d'une multitude de résistances chez les microorganismes.

Les β -lactamines sont les antibiotiques les plus utilisés en clinique. Chez les bactéries à Gram négatif, la résistance bactérienne aux β -lactamines est due principalement à la production d'enzymes (β -lactamases) capables d'hydrolyser l'anneau β -lactame commun à cette classe d'antibiotiques. Plus de 250 β -lactamases différentes ont été isolées jusqu'à ce jour (Essack, 2001). Les compagnies pharmaceutiques ont développé de nouveaux antibiotiques résistants aux β -lactamases et des inhibiteurs de β -lactamases pour contrer le problème de la résistance aux β -lactamines sans succès définitif. En effet, de nombreuses β -lactamases résistantes aux inhibiteurs ou capables d'hydrolyser les nouvelles molécules, ont été isolées (Massova et Mobashery, 1998). Dérivant par mutation de pénicillinases et appelées pour cette raison TEM résistantes aux inhibiteurs (IRT), ces enzymes se caractérisent par une activité hydrolytique réduite pour les amino-, carboxy- et ureido-pénicillines. Elles ont également une interaction altérée et une faible affinité pour les inhibiteurs compétitifs des β -lactamases, tel l'acide clavulanique (Cantón *et coll.*, 2008).

Ce travail s'inscrit donc dans cette problématique générale qui consiste à chercher une autre molécule qui peut remplacer les inhibiteurs suicides (clavulanate, tazobactam et sulbactam). Nous nous sommes intéressés plus particulièrement à l'effet des flavonoïdes sur une β -lactamase isolée de souche d'*E.coli* résistantes à l'acide clavulanique. Nous avons fixé comme objectifs les points suivants :

- Caractérisation phénotypique d'une souche d'*E. coli* résistante à l'acide clavulanique
- Isolement et purification de la β -lactamase responsable de cette résistance
- Caractérisation biochimique de la β -lactamase isolée
- Etude de l'effet inhibiteur de quelques flavonoïdes et détermination de leurs profils d'inhibition
- Etude de la relation structure-activité

Le présent manuscrit est organisé en trois parties :

- La première partie est consacrée à la compréhension du problème de la résistance aux β -lactamines et à la structure et fonction des β -lactamases. Elle englobe également les différents inhibiteurs des β -lactamases spécifiques et une revue générale sur les flavonoïdes.
- La deuxième partie décrit le mode opératoire et les différentes techniques utilisées.
- La troisième partie présente les résultats obtenus.
- Enfin, la dernière partie comporte une conclusion et la présentation de quelques perspectives qui peuvent être développées ultérieurement.

1 Généralités

1.1 Résistance bactérienne aux antibiotiques

Il n'est pas surprenant que la résistance bactérienne aux antibiotiques apparaisse étant donné l'usage intensif à titre préventif ou thérapeutique des antibiotiques.

L'étude des mécanismes génétiques et biochimiques, responsables de la résistance des bactéries aux antibiotiques, permettent de mieux comprendre les bases moléculaires de la résistance et les facteurs responsables de sa dissémination. Cette résistance peut être soit naturelle, soit acquise.

1.1.1 Résistance naturelle

La résistance naturelle ou intrinsèque est un caractère d'espèce qui touche toutes les cellules de toutes les souches. Elle est stable et se transmet à la descendance, mais elle n'est pas ou peu transmissible de manière horizontale. Elle a pour support génétique le chromosome bactérien et elle permet de définir le spectre d'activité des antibiotiques (Tandé, 2005 ; Kayser *et coll.*, 2005).

1.1.2 Résistance acquise

La résistance acquise est un caractère qui ne concerne que quelques souches d'une espèce donnée. La résistance acquise est moins stable, mais elle se propage souvent de façon importante dans le monde bactérien. La bactérie peut acquérir une résistance aux antibiotiques par deux mécanismes génétiques majeurs. L'un a pour support le chromosome et est défini comme une résistance chromosomique, l'autre a pour support les plasmides ou les éléments transposables ou les intégrons et on parle, dans ce cas, de résistance extra-chromosomique (Tandé, 2005 ; Maiti *et coll.*, 2006).

- Résistance chromosomique

La résistance chromosomique résulte d'une mutation au niveau du chromosome ce qui a pour conséquence la perte ou la modification d'une protéine structurale ou enzymatique (Franklin et Snow, 2005).

- **Résistance extra-chromosomique**

En clinique, dans 80 % des cas, la résistance provient de l'acquisition de gènes par transfert entre bactéries, soit par conjugaison, transformation (pénétration dans une bactérie réceptrice d'ADN libre) ou transduction (transfert par l'intermédiaire d'un bactériophage). Les produits de synthèse assurent la résistance à un ou plusieurs antibiotiques (Poly *et coll.*, 2000). Ces transferts sur un mode horizontal sont à l'origine d'une dissémination très importante au sein des populations bactériennes. Ainsi, la résistance plasmidique est souvent qualifiée de contagieuse ou d'infectieuse (Maiti *et coll.*, 2006).

1.1.3 Mécanisme biochimique

Les mécanismes biochimiques de la résistance peuvent être regroupés en quatre grands types :

1. Perméabilité membranaire

Une diminution de la perméabilité résulte souvent d'une mutation affectant la structure des porines ou réduisant leur synthèse. Les porines sont des protéines produisant des canaux de diffusion à travers la membrane cytoplasmique. Malgré ces canaux, l'influx de certains antibiotiques est presque impossible ou extrêmement lent à cause d'une ouverture étroite (entre 7 et 10 Å) ou une très grande taille de la molécule d'antibiotique (Nikaido, 2001). Une perte de ces canaux de diffusion spécifique représente un moyen efficace pour contrer l'action de l'antibiotique. Ce phénomène a été observé chez des mutants de *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae* où la perte de la porine OmpD2 et OmpK36 est responsable de la résistance à l'imipenem (Jacoby *et coll.*, 2004 ; Livermore, 2001).

2. Transporteurs à efflux

Les transporteurs à efflux sont localisés au niveau de la membrane cytoplasmique. Chez les bactéries à Gram négatif, la membrane externe représente une barrière contre la sortie de l'antibiotique lorsque celui-ci est chassé du cytoplasme vers le périplasme. Afin d'éliminer ces composés chimiques de la région périplasmique, il existe des protéines accessoires retrouvées dans le périplasme qui sont liées aux pompes à efflux et aux porines. Ces protéines accessoires servent donc de pont entre les transporteurs à efflux de la membrane

cytoplasmique et les canaux de diffusion de la membrane externe, permettant ainsi l'élimination des composés chimiques dans le périplasme (Franklin et Snow, 2005 ; Lynch, 2006).

La faible perméabilité de la membrane externe ne peut être en cause pour un niveau élevé de résistance. Il faut alors la contribution d'un deuxième facteur permettant la résistance. En combinaison avec les pompes efflux, la faible perméabilité au niveau de la membrane externe contribue dans la production, au niveau clinique, de souches bactériennes résistantes à plusieurs familles d'antibiotiques (Franklin et Snow, 2005 ; Wilke *et coll.*, 2005).

3. Modification des cibles d'action

L'altération d'une cible peut diminuer son affinité pour un antibiotique, empêcher sa fixation et limiter ainsi son action inhibitrice. Les PLP ou protéines liant les pénicillines sont des enzymes qui catalysent l'étape finale de la biosynthèse du peptidoglycane et sont la cible des β -lactamines. Chez des souches de *Staphylococcus aureus*, l'acquisition d'une nouvelle PLP, la PLP_{2a}, est responsable de la résistance de ces espèces à la méthicilline et autres pénicillines résistantes aux pénicillinases (Wilke *et coll.*, 2005).

4. Inactivation enzymatique

L'inactivation enzymatique par les β -lactamases est le mécanisme de résistance le plus répandu. Les β -lactamases sont des enzymes capables de cliver le cycle β -lactame et rendent l'antibiotique inactif (Yoneyama et Katsumata, 2006). La résistance ne provient pas uniquement de l'augmentation de l'activité de l'enzyme vis-à-vis d'un substrat, mais parfois d'une augmentation de la synthèse de l'enzyme. Certaines mutations dans les promoteurs provoquent des changements dans la régulation transcriptionnelle provoquant une surproduction des β -lactamases (Wu *et coll.*, 1995).

1.2 Les β -lactamines

1.2.1 Généralités

Les β -lactamines sont une grande famille d'antibiotiques utilisés dans le traitement de plusieurs infections à Gram positif et à Gram négatif. Ces molécules représentent plus de 65%

du marché mondial des antibiotiques avec plus de 50 molécules commercialisées (Poole, 2005). Leurs structures ont en commun un cycle β -lactame nitré à 4 sommets qui constitue la fonction chimique indispensable à l'activité antibactérienne de la β -lactamine (Fig. 1).

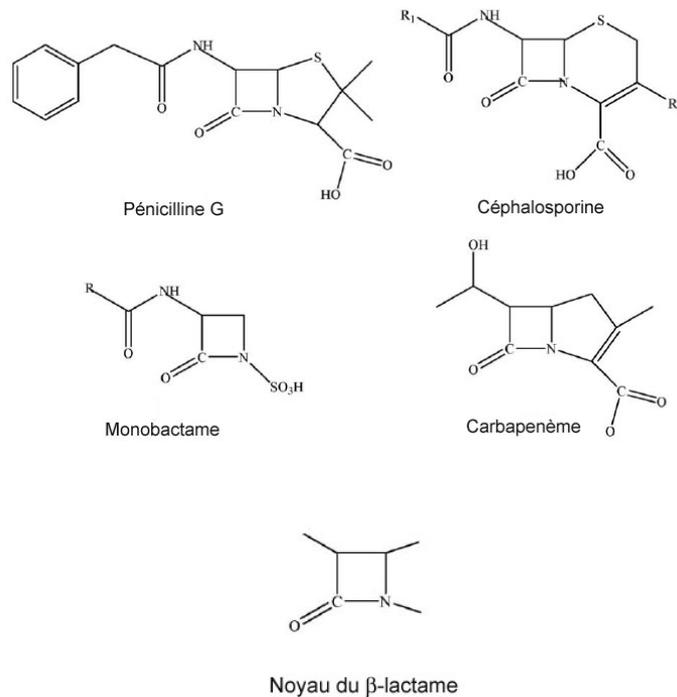


Figure. 1 : Cycle d'un anneau β -lactame et les structures du noyau de base des β -lactamines (Babic *et coll.*, 2006).

Les β -lactamines comprennent 5 sous-classes : les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes et les monobactames, ainsi que les inhibiteurs des β -lactamases discutés plus loin et qui n'ont pas d'activité antibactérienne intrinsèque.

- Les pénicillines sont classées en fonction des différents substituants fixés à l'acide 6-aminopénicillanique, ce qui détermine des propriétés pharmacologiques et antibactériennes différentes.
- Les céphalosporines sont classées par génération et en fonction de leur spectre d'action anti-microbien.
- Les monobactames sont actifs sur les bacilles à Gram négatif et résistent relativement bien aux β -lactamases. Ils sont inactifs sur les bacilles à Gram positif.
- Les carbapénèmes sont des β -lactames à large spectre réservés aux infections résistantes et aux infections à *Enterobacter* (Essack *et coll.*, 2001).

1.2.2 Mode d'action des antibiotiques à noyau β -lactame

Les β -lactamines ont pour cible les enzymes de la synthèse de la paroi bactérienne ou le peptidoglycane. Cette synthèse s'effectue en trois étapes : une étape cytoplasmique, une étape membranaire et une étape périplasmique qui implique des réactions de transglycosylation et de transpeptidation catalysées par des enzymes appelées les protéines liant la pénicilline (PLPs) (Fig. 2).

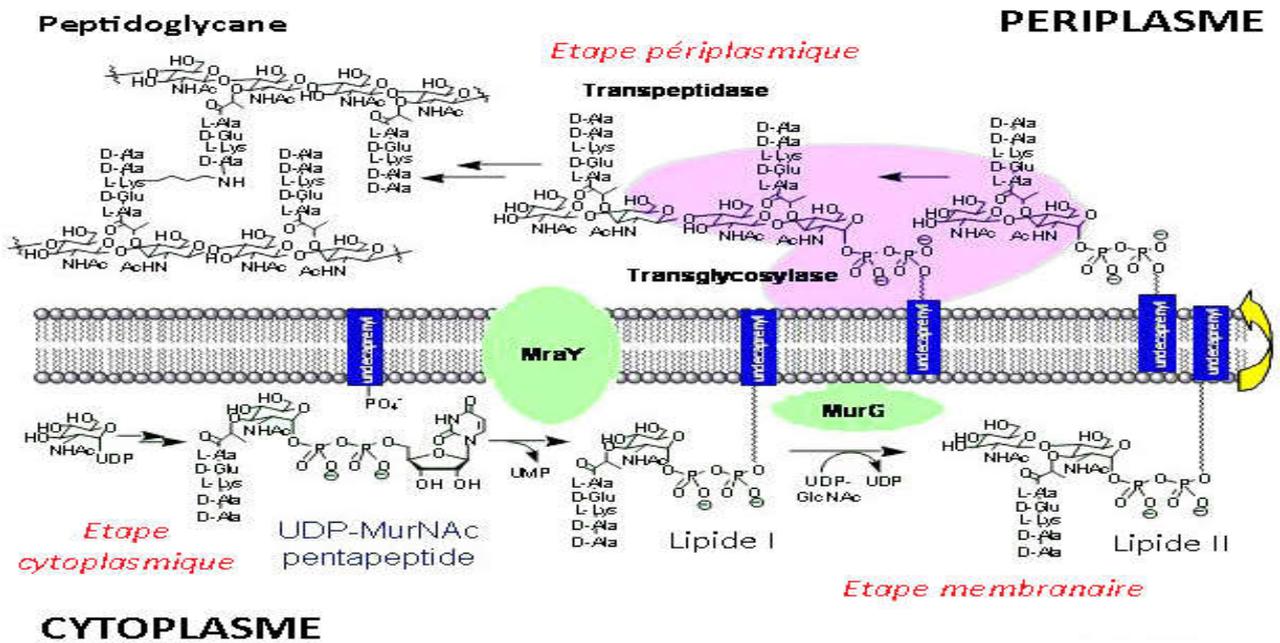


Figure. 2 : Les différentes étapes de la synthèse du peptidoglycane .

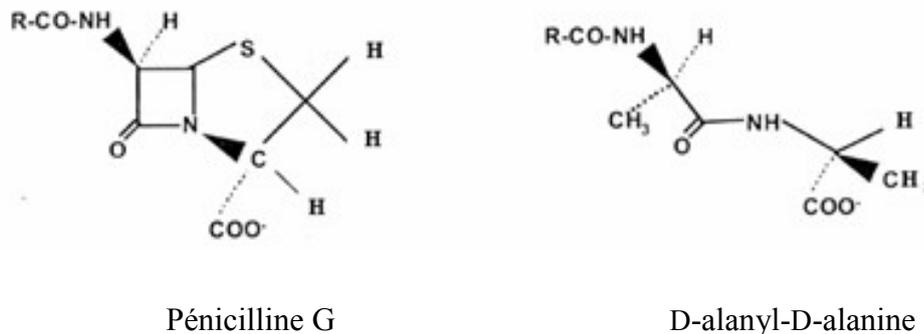


Figure. 3 : Similarité de structure entre les antibiotiques à noyau β -lactames et la pénicilline et le substrat naturel des DD-peptidases (D-alanyl-D-alanine).

1.3 Les β -lactamases

Les β -lactamases font partie de la grande famille des PLPs. Dans le cas des PLPs, la formation du complexe acyl-enzyme (étape d'acylation) est très stable (la constante de vitesse d'hydrolyse $k \approx 0,001 \text{ s}^{-1}$ et $t_{1/2} > 10 \text{ min}$). Tandis qu'en présence des β -lactamases, le complexe subit une réaction d'hydrolyse rapide ($k \approx 10^4 \text{ s}^{-1}$), ce qui a pour conséquence l'inactivation de l'antibiotique (Fig. 4) (Frère, 1995). En comparant un grand nombre de séquences peptidiques des β -lactamases et des PLPs maintenant disponibles, Massova et Mobashery (1998) ont démontré par phylogénie que toutes ces enzymes ont évolué à partir d'un ancêtre commun.

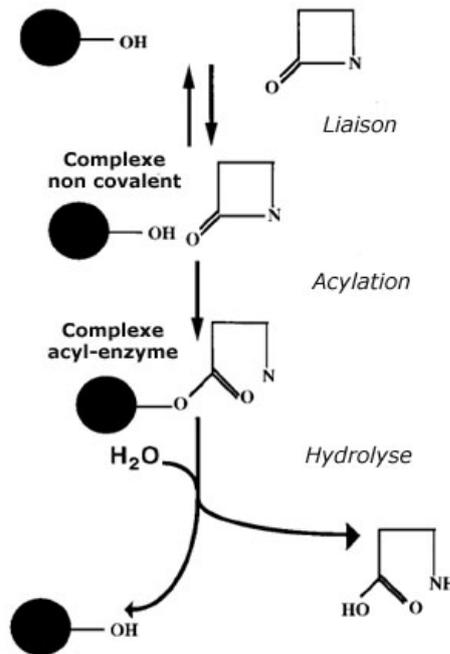


Figure. 4 : Mode d'action des β -lactamases à sérine. L'hydrolyse finale libère un antibiotique inactif (Livermore *et coll.*, 1998).

Les gènes *bla* codant ces enzymes peuvent être chromosomiques ou plasmidiques. En général, l'expression des enzymes plasmidiques est constitutive, tandis que celle des enzymes

chromosomiques est inductible, l'antibiotique jouant un rôle d'inducteur (Babic *et coll.*, 2006). Chez les bactéries à Gram positif, l'inactivation de l'antibiotique s'effectue à l'extérieur de la cellule bactérienne grâce à des β -lactamases extra-cellulaires ou liées à la membrane externe, alors que chez les bactéries à Gram négatif, l'inactivation a lieu dans l'espace périplasmique (Fig.5) (Maiti *et coll.*, 2006).

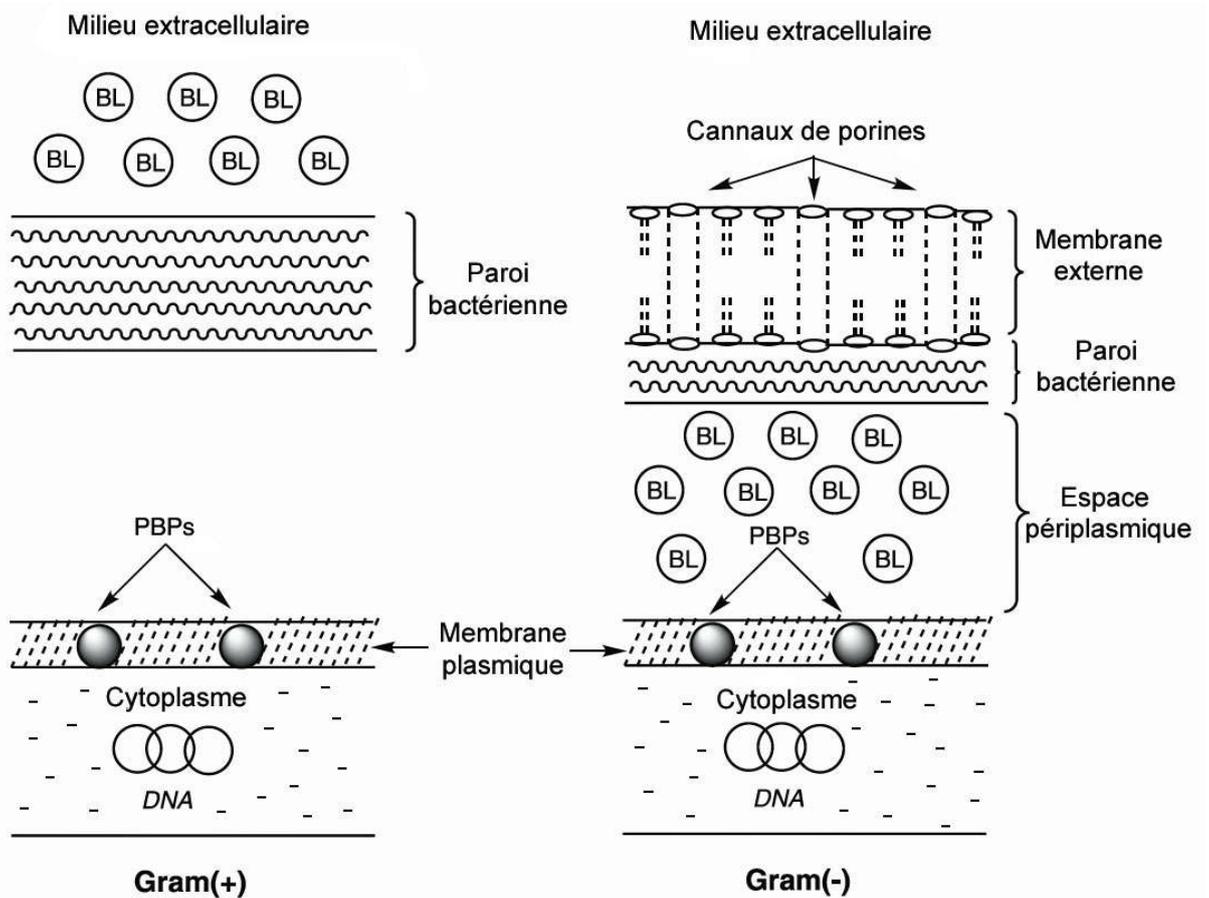


Figure. 5 : Localisation de la β -lactamase dans les bactéries à Gram positif et à Gram négatif (Maiti *et coll.*, 2006).

1.3.1 Classification des β -lactamases

Depuis la découverte des β -lactamases, plusieurs classifications ont été proposées. La première classification, établie par Sawai *et coll.* (1968), permettait de décrire les pénicillinases et les céphalosporinases. D'autres classifications sont basées sur des paramètres biochimiques tel que le profil de substrat (Richmond et Sykes, 1973), le point isoélectrique (Sykes et Matthew, 1976 ; Bush *et coll.*, 1995). Actuellement, deux classifications sont adoptées. La première, proposée par Ambler en 1980, est structurale et est basée sur l'identité et la structure moléculaire du site actif de l'enzyme. La deuxième, fonctionnelle, a été initialement décrite par Jack et Richmond en 1970 pour ensuite être modifiée par Bush en 1995. La version récente propose de classer ces enzymes en fonction de la spécificité de substrat et le profil d'inhibition par le clavulanate. Cette classification phénotypique des β -lactamases pose cependant un problème puisque différentes mutations ponctuelles peuvent influencer leurs susceptibilités aux substrats et inhibiteurs (Thomson et Moland, 2000).

1.3.1.1 Classification d'Ambler

C'est une classification moléculaire basée sur l'homologie des séquences peptidiques des β -lactamases. Elle est divisée en 4 classes : A, B, C et D. Les classes A, C et D possèdent un résidu sérine au niveau de leur site actif alors que la classe B est une métallo- β -lactamase qui a un ion zinc dans le site actif (Tab. 1) (Jacoby *et coll.*, 2005).

Tableau. 1 : Classification moléculaire et phénotypique des β -lactamases (Livermore, 1995).

Classe structurale (Ambler)	Groupe fonctionnel (Bush)	Activité							Inhibition par le clavulanate	
		Pénicilline	Carbénicilline	Oxacilline	Céphaloridine	Céfotaxime	Aztréonam	Imipénème		
β -lactamases à sérine										
A	2a	+++	+	–	±	–	–	–	–	++
	2b	+++	+	+	++	–	–	–	–	++
	2be	+++	+	+	++	++	++	–	–	++
	2br	+++	+	+	+	–	–	–	–	–
	2c	++	+++	+	+	–	–	–	–	+
	2e	++	++	–	++	++	++	–	–	++
	2f	++	+	?	+	+	++	++	++	+
C	1	++	±	Inhibiteur	+++	+	Inhibiteur	–	–	–
D	2d	++	+	+++	+	–	–	–	–	±
Non déterminé	4 ^c	++	++	++	V	V	–	–	–	–
Métallo- β -lactamases										
B	3	++	++	++	++	++	–	–	++	–

La classe A regroupe le plus grand nombre d'enzymes (environ 215) (Bush, 1999). Leurs poids moléculaire varient de 14 à 48 KDa et un *pI* entre 3,5 et 10 (Bush *et coll.*, 1995). Ce

sont des pénicillinases et des céphalosporinases fréquemment codées par des plasmides et des transposons (Bonomo et Rice, 1999) et sont fortement inhibées par l'acide clavulanique (Monnaie et Frère, 1993).

La classe B comporte des enzymes de poids moléculaire entre 25 et 118 KDa avec des *pI* entre 2,5 et 10,5 (Philippon *et coll.*, 1998). Ce sont des pénicillinases, des céphalosporinases, des oxacillinases et des carbapénèmases chromosomiques et plasmidiques. Elles ne sont pas inhibées par l'acide clavulanique mais plutôt par des agents chélateurs comme l'EDTA, les *O*-phenanthrolines et l'acide dipicollonique (Hernandez-Valladares *et coll.*, 2000).

La classe C comporte des enzymes de poids moléculaire compris entre 29 et 43 KDa avec un *pI* entre 6,8 et 10 (Matagne *et coll.*, 1999). Ce sont des enzymes qui dégradent les céphalosporines. Elles sont codées par des chromosomes (Buynak, 2006) et ne sont pas inhibées par l'acide clavulanique (Monnaie et Frère, 1993).

La classe D représente des enzymes de poids moléculaire entre 23 et 44 KDa avec un *pI* de 8,2 à 8,6 (Golemi *et coll.*, 2000). Ce sont des enzymes chromosomiques et plasmidiques (Buynak, 2006) qui hydrolysent l'oxacilline (Babic *et coll.*, 2006). Elles ne sont pas inhibées par l'acide clavulanique, mais sensibles au NaCl (Poirel et Nordmann, 2002). Les OXA β -lactamases de *Acinetobacter baumannii* et *Pseudomonas aeruginosa* représentent le groupe le plus répandu qui se propage de manière rapide (Walther-Rasmussen et Hoiby, 2006).

1.3.1.2 Classification de Bush, Jacoby et Medeiros

La classification biochimique la plus complète et la plus récente est celle de Bush *et coll.* (1995). Elle divise les β -lactamases en 4 groupes en se basant sur le profil hydrolytique (profils du substrat et de l'inhibiteur) d'une part et la structure primaire en acides aminés d'autre part (Tab.1). C'est une réorganisation des classes proposées par Ambler.

Le groupe 1 regroupe les enzymes qui hydrolysent les céphalosporines non inhibées par l'acide clavulanique. Il correspond à la classe C d'Ambler.

Le groupe 2 est constitué de pénicillinases, de céphalosporinases, de β -lactamases à spectre large, d'oxacillinases et de carbapénèmases. Ces enzymes sont inhibées par l'acide clavulanique et correspondent aux enzymes appartenant aux classes A et D d'Ambler. Le

groupe 2 contient le plus grand nombre d'enzymes et est subdivisé en sous-groupes en fonction du profil des substrats (Bonomo et Rice, 1999).

Le groupe 3 comporte des métallo-enzymes qui ne sont pas inhibées par l'acide clavulanique. Elles correspondent à la classe B d'Amblar. La plus remarquable propriété de ces enzymes est leur capacité à hydrolyser les carbapénèmes.

Le groupe 4 regroupe des enzymes qui ne sont pas encore caractérisées surtout sur le plan structural (Bush, 2001).

1.3.2 Structure et fonction des β -lactamases

La détermination des structures tridimensionnelles des β -lactamases par cristallographie aux rayons X a permis de comprendre les mécanismes de résistance, d'expliquer les mécanismes d'inhibition et de montrer les similitudes structurales de ces enzymes (Fig. 6).

En se basant sur le site actif, nous pouvons regrouper les β -lactamases en deux groupes :

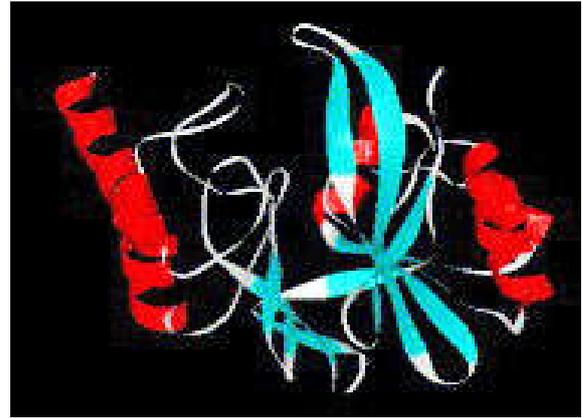
1.3.2.1 β -lactamases à sérine active

Les enzymes ayant un résidu serine au site actif (classes A, C et D) sont constituées de deux domaines :

- un domaine tout en hélices α
- un domaine hybride en hélices α et feuillets β



SHV-1. β -lactamase de classe A



IMP-1. β -lactamase de classe B



P99. β -lactamase de classe C



OXA-1. β -lactamase de classe D

Figure. 6 : Structures des β -lactamases (Babic *et coll.*, 2006).

Le site actif se retrouve à l'interstice des deux domaines. Au niveau des acides aminés impliqués dans la catalyse d'un substrat. Trois éléments structuraux sont conservés chez ces trois classes d'enzymes :

1. Le premier élément se trouvant du côté N-terminal du site actif de l'enzyme et est constitué de la séquence Ser₇₀-Xaa-Xaa-Lys₇₄. Cette tétrade est localisée au niveau du premier tour de l'hélice H2 suite au passage de la charpente du domaine tout α au domaine α/β .

2. Le deuxième élément conservé est formé d'une triade (positions 130-132) situé sur une boucle entre les hélices α_4 et α_5 . Chez les classes A, le premier résidu de cette triade est constitué d'une sérine alors que l'on retrouve une tyrosine pour les classes C et D. Le deuxième résidu est différent pour les trois classes alors que l'asparagine est presque toujours présente en troisième position sauf pour quelques exceptions où l'on retrouve une sérine chez certaines β -lactamases de la classe A.
3. Le troisième élément conservé est aussi constitué d'une triade (positions 234-236). Il est situé dans le domaine α/β sur le brin B3. Cette triade, constituée des acides aminés Lys₂₄₃-Thr (Ser)-Gly₂₃₆, forme le côté opposé du site actif et fait face à la boîte Ser₁₃₀-Asp-Asn₁₃₂.
4. Un quatrième élément conservé chargé négativement est presque identifié chez toutes les β -lactamases. Il semble jouer un rôle catalytique seulement chez les enzymes de classe A. Cet élément est situé sur une boucle de 16 à 19 résidus (Arg161 \rightarrow Asn179 dans la β -lactamase TEM-1). Cette boucle, appelée boucle Ω , est relativement mobile et se trouve à l'entrée du site catalytique. Dans la plupart des cas, elle contient la séquence Glu166-Xaa-Glu-Leu-Asn170. Le glutamate 166 et l'asparagine 170 sont liés par un pont hydrogène et semblent essentiels pour le positionnement de la molécule d'eau W1 près de la sérine catalytique (Lamotte-Brasseur, 1991 ; Frère, 1995).

Ces éléments conservés peuvent être impliqués soit dans la catalyse de l'hydrolyse du substrat, la reconnaissance du substrat ou la fixation de l'inhibiteur.

1.3.2.2 Les métallo-enzymes

Les métallo-enzymes sont des β -lactamases qui utilisent 1 ou 2 atomes de zinc pour inactiver les β -lactames à l'exception des monobactames. Cette classe est subdivisée en 3 groupes B1, B2 et B3 en se basant sur la structure primaire. Cette classification présente des complications à cause du faible degré de similarité entre les sous classes. Toutefois, grâce à l'identification de la structure secondaire par diffraction aux rayons X, il apparaît que les métallo-enzymes ont des éléments structuraux secondaires semblables. La première métallo- β -lactamase a été identifiée chez *Bacillus cereus* par Sabbath et Abraham en 1966. Sa

caractérisation a permis de démontrer qu'elle est une céphalosporinase inhibée par l'EDTA (Bebrone, 2007).

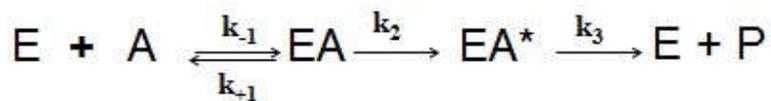
Les structures tertiaires de ces enzymes montrent qu'elles sont constituées de 5 hélices α et 12 feuillets β organisés en 2 domaines :

- Le premier domaine, du côté de l'extrémité N-terminale, comporte 7 feuillets β et 3 hélices α .
- Le second domaine est constitué de 5 feuillets β et de 2 hélices α (Fig. 6).

Ces deux domaines sont liés par une chaîne de 8 résidus d'acides aminés (121 à 128) (Heinz et Adolph, 2004).

1.3.3 Mécanisme catalytique

Toutes les β -lactamases inactivent les β -lactamines en coupant l'anneau β -lactame rendant ainsi l'antibiotique inactif. L'hydrolyse des β -lactamines par les β -lactamases à sérine active se fait par un mécanisme en trois étapes :



E : enzyme ; A : antibiotique ; EA : complexe de Michaelis non covalent ; EA* : complexe acyl-enzyme ; P : produit inactif

1. La première étape est la formation d'un complexe réversible. Le substrat entre dans le site actif de l'enzyme où il est retenu par des liaisons hydrogène.
2. La deuxième étape est la formation d'un complexe irréversible, l'acyle-enzyme. L'acylation se produit lors de l'attaque nucléophile du groupement carbonyle de l'anneau β -lactame par le groupement hydroxyle d'une sérine du site actif.
3. La troisième étape est la libération du substrat devenu un produit inactif, un acide pénicylloïque. L'enzyme est ensuite prête à hydrolyser une autre molécule de β -

lactamine. La désacylation nécessite une molécule d'eau comme accepteur final d'électrons (Minasov *et coll.*, 2003 ; Matagne et Frère 1995 ; Chen et Herzberg, 2001).

1.4 Les inhibiteurs

Afin de prévenir l'hydrolyse des β -lactamines, deux approches ont été utilisées. La première utilise la modification de l'antibiotique le rendant insensible à l'action des β -lactamases. La deuxième approche a été l'utilisation d'une combinaison d'un inhibiteur de β -lactamases avec une β -lactamine. Une thérapie avec ce type de combinaison est basée sur l'effet synergique des deux molécules : l'inhibiteur supprime l'activité de la β -lactamase et protège les β -lactamines qui peuvent alors se lier aux PLPs (Sandanayaka et Prashad, 2002). L'inhibition la plus efficace et la plus spécifique est causée par des molécules ayant des structures analogues aux β -lactamines et dépourvues d'une activité antibactérienne (Chaïbi *et coll.*, 1999).

Les inhibiteurs des β -lactamases se caractérisent par leur mécanisme d'action. Ces analogues structuraux subissent l'étape d'acylation, et en l'absence d'étape de désacylation, ils restent accrochés à l'enzyme formant des complexes très stables.

Il existe trois inhibiteurs utilisés en clinique : l'acide clavulanique, le sulbactam et le tazobactam. Ces inhibiteurs sont des dérivés de la pénicilline et possèdent un anneau β -lactame avec une chaîne latérale modifiée (Fig. 8) (Maiti *et coll.*, 2006).

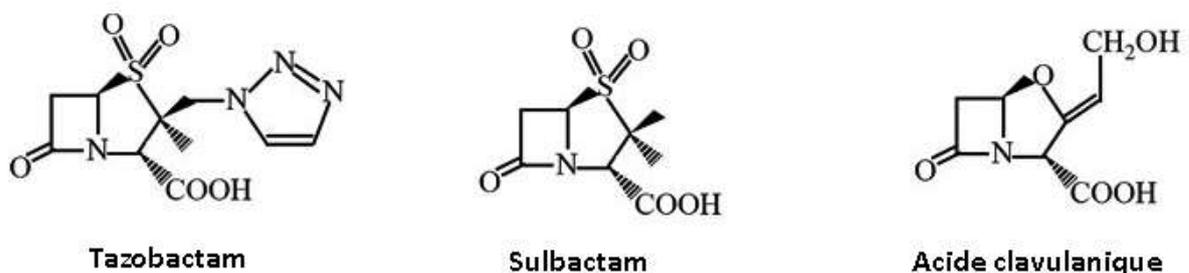


Figure. 7 : Structure chimique des inhibiteurs de β -lactamases

1.4.1 Caractéristiques structurales et fonctionnelles

1.4.1.1 Acide clavulanique

L'acide clavulanique ou le clavulanate, seul inhibiteur naturel, produit par *Streptomyces clavugerus*. C'est une β -lactamine qui inactive les β -lactamases d'une grande variété de bactéries à Gram négatif et à Gram positif, *in vitro* et *in vivo* (*Staphylococcus*, *Hemophilus*, *E. coli* et *Klebsiella*) (Li et Townsend, 2006). C'est un inhibiteur irréversible agissant sur les β -lactamases intra- et extracellulaires (Finlay *et coll.*, 2003).

L'acide clavulanique, découvert en 1976 (Reading et Cole, 1977), possède un anneau oxapénème avec un oxygène en position 1 et une double liaison en position 2. Il ressemble au noyau de la pénicilline mais diffère par l'absence de la chaîne latérale aminoacyle et par la substitution d'un atome de soufre par l'oxygène en position C1 (Livermore, 1998).

L'acide clavulanique inhibe fortement et de manière irréversible les β -lactamases de la classe A et D ($IC_{50} = 0,06$ à $0,71 \mu\text{M}$), mais il n'a pas d'effet sur les enzymes de la classe C ($IC_{50} > 50 \mu\text{M}$). Il est utilisé en clinique en association avec l'amoxicilline (Augmentin®) et avec la ticarcilline (Timentin®) (Coleman, 2006 ; Baynak, 2006).

1.4.1.2 Sulbactam

Le sulbactam est un inhibiteur semi-synthétique. Il appartient à la classe des sulfopénicillines possédant un noyau péname. C'est un inhibiteur irréversible chez plusieurs β -lactamases avec une très faible activité antibactérienne (Maiti *et coll.*, 2006). Ce composé possède une activité inhibitrice contre les β -lactamases de la classe A ($IC_{50} = 1,7 \mu\text{M}$) et une activité plus élevée que celle du clavulanate contre les enzymes de la classe C ($IC_{50} = 5 \mu\text{M}$) (Coleman, 2006).

En examinant sa structure (Fig. 8), nous retrouvons un élément commun chez les β -lactamines, l'anneau β -actame. La β -lactamase ayant une affinité à cette structure, va initier la réaction comme si c'était une β -lactamine. Cependant, ce sont les chaînes latérales du sulbactam qui vont jouer un rôle dans l'inactivation. Des études ont démontré que le groupe sulfone se retrouve dans l'ouverture du site actif en n'ayant aucune interaction avec les résidus du site actif (Imtiaz *et coll.*, 1994). D'autre part, le carboxylate sur le C3 de l'anneau contenant

le groupe sulfone joue un rôle important dans le positionnement du sulbactam dans le site catalytique de la β -lactamase.

Le sulbactam est commercialisé en combinaison avec l'ampicilline sous le nom d'Unasyn® et dans certains pays avec la céfoperazone sous le nom de Sulperazone®. Son activité antibactérienne est modeste contre la plupart des bactéries mais l'Unasyn® est actif contre les souches productrices de β -lactamases telles que *S. aureus*, *H. Influenzae*, *N. gonorrhoeae*, *Bacteroides spp.* (Buynak, 2006).

1.4.1.3 Tazobactam

Le tazobactam est un inactivateur synthétique de β -lactamase possédant une bonne affinité pour les β -lactamases de la classe A ($IC_{50} = 0,03 \mu M$) et la classe C ($IC_{50} = 0,92 \mu M$). Son spectre d'activité inhibitrice est plus large que celui du clavulanate et du sulbactam.

Cet inactivateur se retrouve dans la même classe que le sulbactam, les sulfopénicillines. Le tazobactam contient un noyau péname possédant un anneau triazole. En dépit d'une grande similarité structurale avec le tazobactam, le sulbactam possède une activité inhibitrice supérieure. Ceci serait dû à la présence de triazole. Il est actuellement utilisé en association avec la pipéracilline sous le nom commercial de Tazocin® (Buynak, 2006 ; Coleman, 2006).

1.4.2 Mécanisme d'inhibition : cas de l'acide clavulanique

Plusieurs étapes d'inhibition ont été proposées pour l'inactivation d'une β -lactamase par les inhibiteurs suicides. La formation des intermédiaires dans le site actif avec un inhibiteur suicide que ce soit le tazobactam, le sulbactam ou l'acide clavulanique, implique les mêmes mécanismes de protonation et de déprotonation pour effectuer les attaques nucléophiles que ceux utilisés avec les β -lactamines (Sandanayaka et Prashad, 2002).

L'acide clavulanique est reconnu comme un substrat par l'enzyme d'où il est relargué. Cependant une déviation de ce processus mène à l'inactivation irréversible de la β -lactamase. Il y a d'abord formation du premier intermédiaire tétrahédrique non-covalent, suivie de la seconde étape qui consiste en la formation d'un acylenzyme. La divergence au niveau des mécanismes

d'inactivation par les inhibiteurs et d'hydrolyse des β -lactamines s'effectue à partir de l'acyl-enzyme. La différence majeure qui caractérise une inhibition par un inhibiteur suicide est l'ouverture de l'anneau cyclique adjacent à l'anneau β -lactame à l'intérieur du site actif. L'ouverture de cet anneau empêche l'étape de la désacylation (Fig. 9) (Yang *et coll.*, 1999).

Suite à la formation de l'acylenzyme par l'attaque nucléophile du groupement hydroxyle de Ser-70 provoquant l'ouverture de l'anneau β -lactame, il y a ouverture de l'anneau clavame qui permet la formation d'un complexe de transition dans un équilibre tautomérique entre la forme imine et énamine (Fig. 9). L'énamine est un *cis*-isomère de l'imine au niveau de la double liaison entre les carbones 5 et 6. Cette tautomérisation est responsable d'une inhibition transitoire de l'enzyme. Par contre, une isomérisation *cis-trans* de l'énamine peut se produire permettant la formation d'un complexe plus stable (Sandanayaka et Prashad, 2002 ; Padayatti *et coll.*, 2005). L'imine peut provoquer l'acylation de l'hydroxyle de la Ser-130 et se fixer à l'enzyme, ce qui conduit à une inhibition irréversible (Therrien et Levesque, 2000).

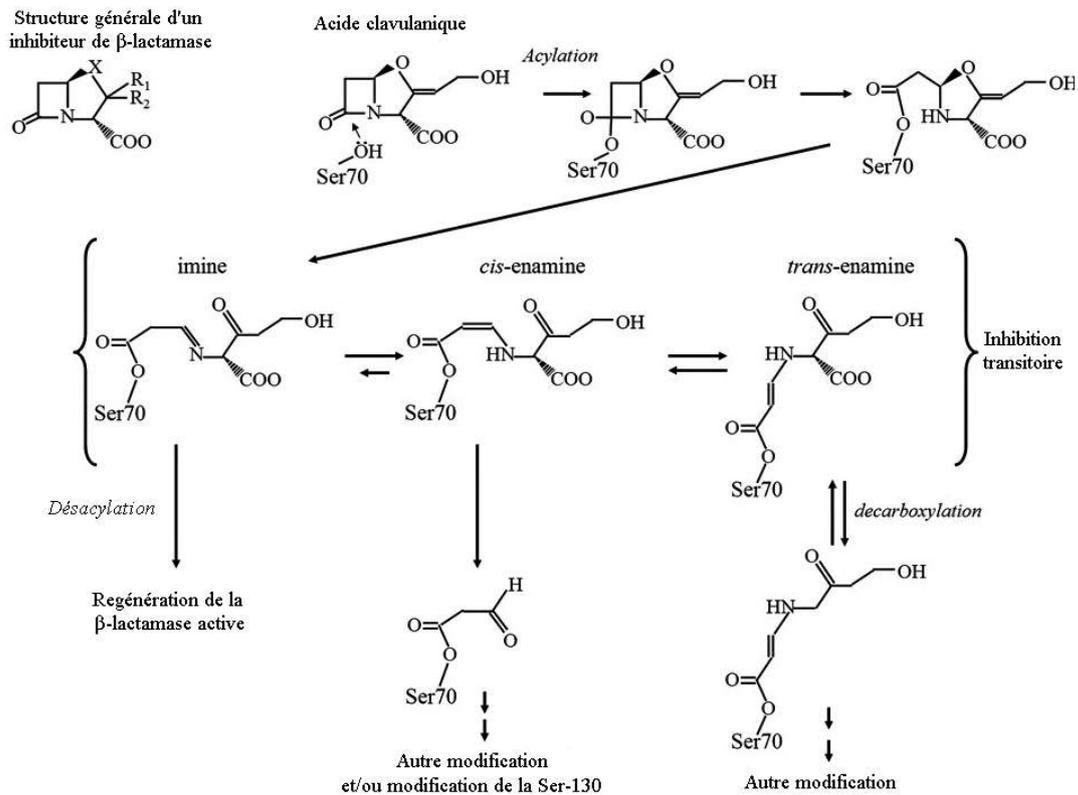


Figure 8 : Schéma du mécanisme de l'inhibition des β -lactamases par l'acide clavulanique. L'inhibition par le sulbactam et le tazobactam est similaire (Padayatti *et coll.*, 2005).

1.4.3 Résistance aux inhibiteurs

Etant donné l'administration clinique des combinaisons antibiotique/inhibiteur et la fréquence des mutations chez les bactéries, il n'est pas surprenant que la résistance aux inhibiteurs ait apparue (Buynak, 2006). Cliniquement, le premier cas de résistance à la combinaison inhibiteur-antibiotique a été isolé en 1989 en France chez des souches d'*E. coli* (Therrien et Levesque, 2000).

La résistance est due à une ou plusieurs mutations en de nouvelles positions du gène *bla* entraînant une ou plusieurs substitutions d'acides aminés (Thomson et Amyes, 1992 ; Vedel *et coll.*, 1992) Les principales mutations sont celles des résidus Met69 et Arg244. Certaines enzymes ont évolué à partir de TEM-1 par deux substitutions simultanées. C'est le cas des TEM-35 (Asn276Asp/Met69Leu), TEM-36 (Asn276Asp/Met69Val), TEM-32 (Met182Thr/Met69Ile) et TEM-45 (Met69Leu/Arg275Gln). La combinaison de 2 substitutions se traduit par l'augmentation de l'IC₅₀ en comparaison avec la substitution Met-69 seule (Bonomo et Rice, 1999) (Tab. 2). La conséquence phénotypique de ces modifications entraîne une résistance aux associations β -lactamine-inhibiteur (Buynak, 2006).

Tableau. 2 : Substitutions d'acides aminés observées chez les souches productrices de β -lactamases résistantes aux inhibiteurs dérivés de TEM (TRI) (Yang *et coll.*, 1999).

Bêta-lactamase	Nom alternatif	Mutation	pI	Clavulanate		Sulbactam		Tazobactam	
				CI_{50} (μ M)	K_I (μ M)	CI_{50} (μ M)	K_I (μ M)	CI_{50} (μ M)	K_I (μ M)
TEM-1			5,4	0,08	0,1	6,1	0,9	0,1	0,01
TEM-30	TRI-1 GUER	TRI-2, R244S	5,2	9,4	7,7	260	19	2,9	0,6
TEM-31	TRI-1, E-SAL	R244S	5,2	31	12	300	34	12	2
	Mutant expérimental	R244Q	5,2		20		71		
	Mutant expérimental	R244T	5,2		7,8		89		
TEM-51	TRI-15	R244H	5,2	9	7,8	350	54	3,5	2,5
TEM-33	TRI-5	M69L	5,4	4	1,65	36	22	0,4	0,2
TEM-34	TRI-6	M69V	5,4	2	0,95	16	7,1	0,5	0,25
TEM-40	TRI-169 TRI-11	M69I	5,4	12	0,45	150	3,1	5	0,15
TEM-32	TRI-3	M69I/M182T	5,4	12		160		5	
	Mutant expérimental	M182T		0,1		11		0,15	
TEM-35	TRI-4	M69L/N276D	5,2	17		62		0,7	
	TRI-4	M69L/N276D	5,2	41		435		3,2	
	Mutant expérimental	N276D	5,2		15,6				
	Mutant expérimental	M69L	5,2		1,7		15		
TEM-36	TRI-7	M69V/N276 D	5,2	2,9		20		2	
TEM-45	TRI-14	M69L/R275Q	5,2	22,5		104		1,48	
TEM-59		S130G	5,5	100	180	35	120	7	17

1.5 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés polyphénoliques naturels. Ce sont des pigments, souvent hydrosolubles largement distribués dans le règne végétal. Plus de 6500 flavonoïdes ont été identifiés dont plusieurs sont responsables des couleurs vives des fleurs et des fruits (Hendrich, 2006).

1.5.1 Structure et classification

Les flavonoïdes sont des dérivés benzo- γ -pyrone (anneaux A et C) (Fig. 10). Les flavonoïdes sont subdivisés en 14 classes différentes dont 6 sont les plus répandues et les mieux caractérisés. Ce sont les flavanones, les flavones, les flavanonols, les flavonols, les flavanols et les isoflavones (Heim *et coll.*, 2002 ; Hendrich, 2006).

La structure de base de ces molécules est caractérisée par 15 atomes de carbone arrangés en trois cycles (Fig. 10). A l'exception des chalcones, ces métabolites secondaires sont toujours tricycliques : deux cycles benzoïques A et B et un hétérocycle C (squelette carboné C6-C3-C6). L'ouverture du cycle oxygéné B caractérise les chalcones (Fig. 10) (Pietta, 2000 ; Yao *et coll.*, 2004 ; Havsteen, 2002).

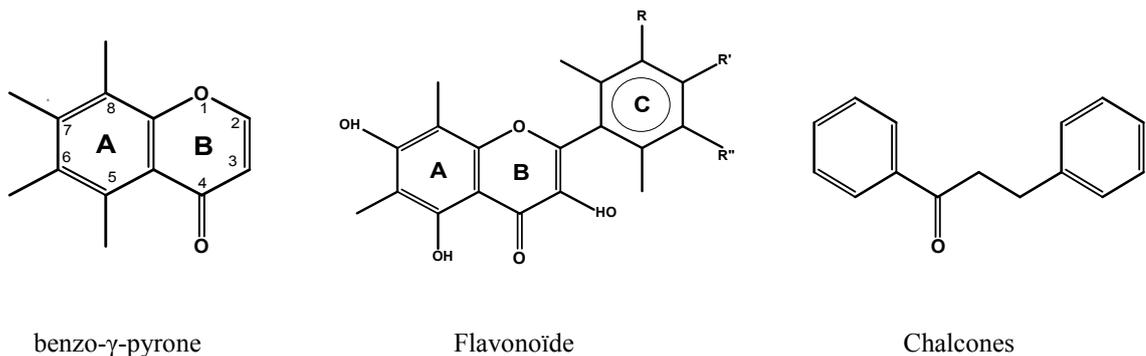


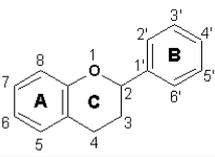
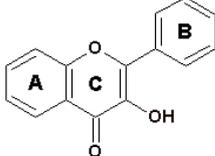
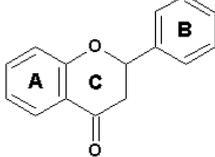
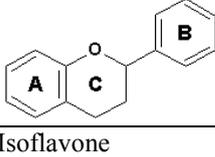
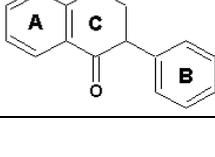
Figure. 9 : Structure générale des composés polyphénoliques (Yao *et coll.*, 2004)

Dans les flavonoïdes, le deuxième cycle benzène (B) se lie à l'hétérocycle (C) en position 2. Lorsque la liaison s'effectue en position 3, les composés résultants sont appelés iso-

flavonoïdes. Les flavonoïdes se distinguent entre eux par les substituants hydroxyles, méthoxyles ou glucidiques sur leurs cycles (Tab. 3) (Das et Rosazza, 2006).

Tableau. 3 : Structure chimique de certains flavonoïdes représentatifs de chaque classe (Heim et coll., 2002).

- L'hétérocycle (C) peut être une pyrone (flavone) ou son dihydrodérivé (flavanone).

Formule chimique	Nom	substitution									
		3	5	6	7	8	2'	3'	4'	5'	
	Apigénine	H	OH	H	OH	H	H	H	OH	H	
	Flavone	H	H	H	H	H	H	H	H	H	
	diosmine	H	OH	H	sucre	H	H	OH	OCH ₃	H	
	Quercétine	OH	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	
	Fisetine	OH	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	
	Morine	OH	OH	H	OH	H	OH	H	OH	H	
	Myricétine	OH	OH	H	OH	H	H	OH	OH	OH	
	Kaempférol	OH	OH	H	OH	H	H	H	OH	H	
	Gossipyne	OH	OH	H	OH	sucre	H	OH	OH	H	
	Rutine	sucre	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	
	Quercitrine	sucre	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	
	Naringénine	H	OH	H	OH	H	H	H	OH	H	
	Catéchine	OH	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	
	Génistéine	H	OH	H	OH	H	H	H	OH	H	

- La fixation d'un groupement hydroxyle (OH) sur le carbone 3 dans les deux cas précédents constitue respectivement les flavonols et les flavanonols (Bravo *et coll.*, 1998).
- La substitution de l'un des groupements hydroxyles par un sucre ou un groupement méthyle donne naissance aux flavonoïdes glycosylés et flavonoïdes méthylés (Yao *et coll.*, 2004 ;

1.5.2 Activités biologiques des flavonoïdes

La présence d'un groupement oxy en position 4, d'une double liaison entre C2-C3 et d'un groupement hydroxyle en position 3 dans l'hétérocycle C sont nécessaires pour une meilleure activité anti-oxydante et antiproliférative des flavonoïdes (Middleton *et coll.*, 2000).

De nos jours, les propriétés des flavonoïdes sont largement étudiées dans le domaine médical où on leur reconnaît des activités anti-virales, antimicrobiennes, anti-tumorales, anti inflammatoires, anti-allergiques et anti-cancéreuses (Di carlo, 1999).

1.5.2.1 Effets antioxydants

Les flavonoïdes ont une activité antioxydante. Ils sont de bons inhibiteurs d'enzymes responsables de la production des radicaux libres comme la xanthine oxydase, la cyclooxygénase et la lipooxygénase (Cos *et coll.*, 1998 ; Manthey *et coll.*, 2000 ; Middleton *et coll.*, 2000). Les flavonoïdes sont considérés comme de bons chélateurs d'ions métalliques comme les ions Fe^{2+} et Cu^+ qui sont essentiels pour certaines fonctions physiologiques, mais sont aussi responsables de la production du radical hydroxyle par la réduction du peroxyde d'hydrogène (Hendrich, 2006 ; Heim *et coll.*, 2002). Les flavonoïdes hydroxylés sont capables de réduire les radicaux libres oxydants comme le superoxyde, le peroxyde, l'alkoxyde et l'hydroxyle par transfert d'hydrogène (Piettra, 2000 ; Yao, 2004).

1.5.2.2 Effet antiallergique

Ces effets sont attribués à l'influence des flavonoïdes sur la production de l'histamine. En effet, les flavonoïdes inhibent des enzymes telles que l'AMP cyclique phosphodiesterase et ATPase Ca^{2+} -dépendante, responsables de la libération de l'histamine à partir des mastocytes et des basophiles. En inactivant cette enzyme, la quercétine a montré un potentiel

d'action supérieur à celui du cromoglycate de sodium utilisé comme médicament en empêchant la libération de l'histamine et d'autres substances endogènes à l'origine de l'asthme (Di Carlo, 1999, Middleton *et coll.*, 2000).

1.5.2.3 Effets anti-inflammatoires

Sous l'action de la cyclooxygénase et la lipooxygénase, l'acide arachidonique se métabolise respectivement en prostaglandines et leucotriènes induisant ainsi des phénomènes inflammatoires. Landolfi et son groupe ont montré que certains flavonoïdes sont capables de modifier le métabolisme de l'acide arachidonique dans les plaquettes (Landolfi *et coll.*, 1984).

1.5.2.4 Effets anti-ulcéreux

Dans des expériences réalisées sur des rats, il a été démontré que la quercétine et la naringénine jouent un rôle important dans la réduction de l'ulcère et la protection des cellules gastriques. La quercétine exercerait son activité via un mécanisme complexe impliquant la production du mucus, le piégeage des radicaux libres et également l'inhibition de la production des leucotriènes (Di Carlo, 1999).

1.5.2.5 Effets anticancéreux

Présente pratiquement dans tous les types de thé et en particulier dans le thé vert, la catéchine a montré une activité anti-tumorale. La quercétine inhibe la croissance cellulaire en empêchant certaines phases du cycle cellulaire (Yao, 2004).

1.5.2.6 Effets antimicrobiens

Certains flavonoïdes ont un rôle de phytoalexines, c'est-à-dire de métabolites que la plante synthétise en grande quantité pour lutter contre une infection causée par des champignons ou par des bactéries (Harbonne et Williams, 2000). Plaper et ses coll. (2003) ont démontré que la quercétine inhibe la synthèse de l'ADN en inactivant l'ADN gyrase. D'autre flavonoïdes sophoraflavone G et l'epigallocatechin gallate inhibe la synthèse de la membrane cytoplasmique, et que les licochalcones A et C empêchent le métabolisme énergétique de certaines bactéries (Tim Cushnie et Lamb, 2005).

2 Matériels et Méthodes

2.1 Souche bactérienne

La souche bactérienne *E. coli* K18 provient du laboratoire de bactériologie et de parasitologie du centre hospitalo-universitaire de Sétif. Elle a été isolée en 2002 à partir de patients hospitalisés dans différents services de l'hôpital. C'est une souche résistante à l'Augmentin® (amoxicilline + acide clavulanique). L'identification de la souche a été confirmée au laboratoire au cours d'un travail précédent à l'aide de galeries API-20 (BioMérieux). La souche est cultivée dans le milieu BHI (bouillon cœur-cerveau) et conservée à -20°C dans le même milieu additionné de 10% (V/V) de glycérol.

2.2 Produits chimiques

- Les milieux de culture BHI et Muller Hinton proviennent de Sigma, les bandelettes E-test d'AB biodisk, les disques de Céfinase proviennent de BioMérieux, les marqueurs de poids moléculaire de GE Healthcare, les marqueurs de point isoélectrique de Biorad.
- L'antibiotique pénicilline G, oxacilline, ampicilline, cloxacilline, carbénicilline, céphalothine proviennent de sigma, la nitrocéfine de Oxoid, la piperacilline, l'acide clavulanique et le tazobactam de Wyeth Laboratoris, la céfuroxime et la ceftazidime de Claxo, la céfazoline de Panpharma, la céphotaxime et imipenem de Merk, le sulbactam de Pfizer et l'aztreonam de sanofi Wyeth.
- La colonne de chromatographie d'affinité metaphenyl boronate-agarose est obtenue chez Sigma, la colonne monoQ sépharose provient de Fluka.
- Les produits suivants : acide gallique, acide caféique, diosmine, acide ellagique, quercétine, rutine, catéchine, morine, gossypine, myricétine, fisetine, naringénine, apigénine, quercitrine, kaempférol et flavone ont été obtenus chez Sigma.

2.3 Détermination des CMI

La CMI d'un antibiotique est la plus faible concentration d'antibiotique inhibant toute croissance visible d'un germe donné. Elle est considérée comme la valeur de référence pour définir la susceptibilité d'un microorganisme à un antibiotique. Le profil de sensibilité de la souche *E. coli* K18 a été déterminé par la mesure de CMI de différents antibiotiques par la méthode « E-test ». Il s'agit d'une technique de diffusion d'un gradient de concentration d'antibiotique en milieu gélosé de Muller Hinton préalablement ensemencé à l'aide d'un inoculum bactérien contenant 10^6 UFC/ml. La lecture est réalisée après 24 heures ou 48 heures à 37°C.

Une zone d'inhibition de culture se dessine autour de la bandelette et la CMI correspond à la valeur lue à l'intersection de la culture bactérienne et la bandelette (Fig. 10). Les antibiotiques testés sont : benzylpénicilline (PEN), amoxicilline (AMX), ampicilline (AM), amoxicilline-acide clavulanique (XL), pipéracilline (PP), pipéracilline-tazobactam (PTC), céphotaxime (CT), ceftazidime (CAZ) et méropénème (MEPM).



Figure. 10 : Mesure de la CMI par méthode E-Test

2.4 Production et purification de la β -lactamase

2.4.1 Culture bactérienne

La souche *E. coli* K18 stockée à -20°C est repiquée dans un volume de 10 ml de BHI. Cet inoculum est ensuite incubé à 37°C sous agitation pendant 16 heures. L'inoculum est utilisé pour ensemercer une culture de 1,5 L du même milieu. La culture est conduite dans les mêmes conditions pendant 18h. Le milieu est repris, centrifugé à 18000 g pendant 15 minutes à 4°C et le culot bactérien est récupéré, puis utilisé rapidement ou stocké à -20°C .

2.4.2 Extraction de la β -lactamase

Le culot est suspendu à 10% (P/V) dans le tampon Tris-HCl 20 mM, pH 8 et les cellules sont lysées par 10 à 15 cycles de sonication de 30 secondes chacun à l'aide d'un sonificateur (vibra-cell 50W/60Hz) à une fréquence de 60 kHz jusqu'à ce que l'absorbance à 620 nm atteigne 0,1 à 0,2.

Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 20 000 g pendant 30 minutes à 4°C et le surnageant récupéré est traité au sulfate de streptomycine afin de précipiter les acides nucléiques. Après agitation pendant 2 h à 4°C , le mélange est centrifugé à 18 000 g pendant 30 minutes à 4°C . Le surnageant contenant les protéines est ensuite dialysé contre une solution de tampon Tris-HCl 20 mM, pH 8 à 4°C pendant 24h.

2.4.3 Dosage des protéines et de l'activité enzymatique

2.4.3.1 Dosage des protéines

La quantité de protéines est déterminée selon la méthode de Bradford (1976) améliorée par Macart et Gerbaut (1986).

Des solutions étalons de 0,1 à 2 mg/ml préparées avec l'albumine du sérum bovin (BSA) comme standard. 100 μl de chaque solution étalon et des échantillons aux dilutions appropriées sont ajoutés à 2 ml du réactif de Macart composé de 0,004 % (P/V) de bleu brillant de Coomassie G 250, 4 % (V/V) d'éthanol à 96 %, 0,003 % (P/V) SDS et 10 % (V/V)

d'acide phosphorique à 85 %. Après 10 minutes d'incubation, la densité optique (D.O.) du mélange est mesurée à 595 nm par un spectrophotomètre visible (Spectrotonic 20 Genesis). La concentration des protéines totales est calculée à partir de l'équation de régression linéaire de la gamme d'étalonnage établie avec la BSA (0,1-2 mg/ml) (Annexe 1).

2.4.3.2 Dosage de l'activité enzymatique

L'activité enzymatique est mesurée en présence d'une solution de 200 μM de pénicilline G dans le tampon phosphate 0,1 M, pH 7. L'enzyme est ajouté à un volume réactionnel final de 500 μl et la diminution de l'absorbance est suivie à 235 nm dans un spectrophotomètre UV-visible 8500. La vitesse initiale d'hydrolyse en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ est calculée à partir du coefficient d'extinction moléculaire ($\epsilon_{235\text{nm}}=650 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). Une unité enzymatique est définie comme la quantité de protéine nécessaire pour hydrolyser une μmole de pénicilline G par min à 25°C dans 500 μl de tampon phosphate 0,1 M, pH 7. Les mêmes conditions sont utilisées pour la détermination de tous les paramètres cinétiques.

2.4.4 Purification de la β - lactamase

Plusieurs étapes de purification ont été testées :

- La précipitation au sulfate d'ammonium
- La chromatographie échangeuse d'ions
- La chromatographie d'affinité

2.4.4.1 Précipitation au sulfate d'ammonium

Plusieurs pourcentages de précipitation ont été testés : 50%, 60%, 70% et 80% (P/V). Les protéines sont précipitées par ajout progressif de la quantité adéquate de sulfate d'ammonium et le mélange est mis sous agitation douce pendant 1 heure. Le précipité est récupéré après centrifugation à 18000 g pendant 30 minutes puis suspendu dans le tampon Tris-HCl 20 mM, pH 8. L'activité de la β -lactamase est évaluée à la fois dans le surnageant et le précipité en mesurant l'activité spécifique.

2.4.4.2 Chromatographie échangeuse d'ions sur résine Mono-Q

Cette étape est basée sur le protocole de Hedberg *et coll.* (1995). L'extrait enzymatique est dialysé contre un tampon Tris-HCl 20 mM, pH 8 pendant 24h, puis filtré à travers un filtre de 0,45 μ pour éliminer les impuretés insolubles. Le filtrat est passé sur une colonne (1 \times 10 cm) contenant une résine de type Mono-Q équilibrée dans le même tampon. La chromatographie est réalisée à un débit de 2 ml/min. L'élution est réalisée avec un gradient continu de NaCl entre 0,1 et 0,5 M. Les fractions sont collectées toutes les deux minutes, puis analysées par la détermination de l'activité de la β -lactamase, le dosage des protéines et l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

2.4.4.3 Chromatographie d'affinité sur agarose greffé par l'acide meta-aminophenylboronique

Cette technique est basée sur la technique de Kernodle *et coll.* (1990). La solution enzymatique est dialysée contre un tampon citrate de sodium 0,02 M, pH 6 contenant $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à 0,25 M.

Le gel metaphenylboronate-agarose est lavé avec le tampon 0,25 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /0,5 M acide borique/0,02 M citrate de sodium pH 6, puis par le tampon 0,25 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /0,02 M citrate de sodium pH 6 avec un débit de 2 ml/min. La préparation enzymatique issue de la dialyse est injectée dans la colonne puis l'élution est faite avec 0,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /0,08 M citrate de sodium pH 6 avec le même débit et les fractions sont collectés toutes les 4 minutes. La colonne est ensuite régénérée par lavage avec le tampon 2,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /0,5 M acide borique/0,02M citrate de sodium pH 6 puis conservée à 4°C.

2.5 Détermination du poids moléculaire

Afin de déterminer le poids moléculaire, nous avons réalisé l'électrophorèse en gel de polyacrylamide en milieu dénaturant selon la méthode de Laemmli (1970).

La localisation de la β -lactamase est faite par la technique iodométrique utilisant un gel d'amidon-agar incorporant une solution d'iode/iodure de sodium et de pénicilline G (Mathew et Hedge, 1976). La révélation est basée sur le principe de la réduction du complexe iode-amidon par l'acide pénicilloïque issu de l'hydrolyse de la pénicilline par la β -lactamase, ce qui entraîne une décoloration du gel initialement violet.

Le gel d'amidon-agar est constitué de 0,35 g agar, 0,11 g amidon, 5,81 ml d'une solution de 0,06 M KH_2PO_4 et 14,18 ml d'une solution de 0,06 M Na_2HPO_4 . Le mélange est chauffé jusqu'à ébullition. Après refroidissement, on ajoute 700 μl de la solution iodée (0,5% NaI , 1% I_2) et 333 μl de pénicilline G (17,5 mg/ml). Le gel est coulé, puis laissé pour polymérisation entre deux plaques de verre.

La visualisation du gel d'acrylamide s'effectue comme suit : la 2^{ème} partie du gel d'acrylamide est déposée sur une plaque de verre, puis recouverte délicatement par le gel d'amidon. Après un temps d'incubation de 10 minutes, une bande transparente correspondant à la β -lactamase apparaît sur le gel d'amidon.

Sur la première partie du gel, les bandes protéiques apparaissent en bleu et les vitesses relatives de migration sont déterminées. Sur la deuxième partie, la vitesse relative de migration de la bande transparente correspondant à la β -lactamase est déterminée. Les poids moléculaires des protéines sont déterminés à partir d'une courbe exprimant la mobilité relative en fonction du Log (PM) des protéines standards (Annexe 2).

2.6 Détermination du point isoélectrique

Le point isoélectrique est déterminé par la technique d'isoelectrofocalisation selon le protocole décrit par la société Borad. L'isoelectrofocalisation est réalisée en gel de polyacrylamide contenant 5% d'ampholyte avec un gradient de pH entre 3 et 10 dans les conditions natives. Un gel de polyacrylamide 6% (24,25 % d'acrylamide et 0,75 % de bis acrylamide) contenant 0,5 ml d'ampholyte, 2 ml de glycérol 25% (V/V) et 5,5 ml d'eau distillée est préparé. Le gel est polymérisé par ajout de 15 μL de TEMED et 100 μL de

persulfate d'ammonium, puis coulé sur la face hydrophobe d'un film plastique d'une dimension de 65 × 115 cm.

L'échantillon est dialysé contre 1% de glycine, puis centrifugé à 10000 g pendant 10 minutes et 1 à 2 µl de surnageant sont déposés par puits au milieu du gel. Parallèlement, 1µl de standard par puits est également déposé. L'isoélectrofocalisation est conduite dans une cuve de migration Biorad (Modèle 111) par application d'un courant électrique de 100 V pendant 15 minutes, puis 200 V pendant 15 minutes et enfin 300 V pendant 1,5 h.

A la fin de la migration, le gel est coupé en 2 parties. Une partie est fixée par une solution d'acide trichloracétique 12,5% (P/V) et de méthanol 30% (V/V) pendant 30 min. Le gel est ensuite coloré pendant 2h en présence d'éthanol 27% (V/V), d'acide acétique 10% (V/V), du bleu de Coomassie R-250 0,04% (P/V) et du CuSO₄ 0.5% (P/V). La décoloration se fait dans un premier temps par 12% (V/V) d'éthanol, 7% (V/V) d'acide acétique, 0.5% (P/V) de CuSO₄ et ensuite par une solution de 25% (V/V) d'éthanol, 7% (V/V) d'acide acétique.

La localisation de la β-lactamase est réalisée par le même test iodométrique décrit précédemment. La détermination des *pI* est déterminé à l'aide des *pI* standards suivants : phycocyanine (*pI* 4,45), β-lactoglobuline B (*pI* 5,1), anhydrase carbonique bovine (*pI* 6,0), anhydrase carbonique humaine (*pI* 6,5), myoglobine (deux bandes *pI* 6,8 & 7), hémoglobine humaine A (*pI* 7,1), hémoglobine humaine C (*pI* 7,5), lectine (3 bandes *pI* 7,8 & 8,0 & 8,2), cytochrome C (*pI* 9,6).

2.7 Influence du pH et la température sur l'activité enzymatique

L'activité enzymatique en présence de 200 µM de pénicilline G est mesurée à plusieurs pH allant de 5,5 à 10 utilisant les tampons suivants : 50 mM acétate de sodium pH 5,5 ; 50 mM tampon phosphate pour les pH de 6 à 8, 50 mM Tris-HCl pour les pH de 8,5 à 10.

L'effet de la température est mesuré en incubant l'enzyme à un intervalle de température entre 28°C et 60°C en présence de 200 µM de pénicilline G dans le tampon phosphate 0,1 M, pH 7.

2.8 Détermination des paramètres cinétiques

L'ensemble des cinétiques enzymatiques des substrats et inhibiteurs sont réalisées par une méthode spectrophotométrique utilisant un spectrophotomètre UV-visible (UV-visible 8500). L'activité enzymatique est mesurée par la variation de l'absorbance à une longueur d'onde spécifique pour un substrat donné. Les paramètres cinétiques (K_M , V_{max}) sont déterminés par la représentation de Hanes-woolf et/ou lineweaver-Burk grâce au logiciel « SIGMAPLOT 10.0 » auquel le module « Enzyme Kinetics 1.1 » a été ajouté.

Plusieurs solutions de substrat avec des concentrations finales de 80 à 800 µM sont préparées dans un tampon phosphate 0,1 M contenant la BSA à 5 µg/ml. A chaque concentration, 6 µg de la solution enzymatique sont ajoutés et la variation de l'absorbance est suivie à 25°C à une longueur d'onde spécifique pour chaque substrat (pénicilline G ($\epsilon_{235nm} = 560 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), pipéracilline ($\epsilon_{235nm} = 936 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), oxacilline ($\epsilon_{260nm} = 1000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), cloxacilline ($\epsilon_{260nm} = 1000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), carbénicilline ($\epsilon_{235nm} = 780 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), ampicilline ($\epsilon_{235nm} = 809 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), céphaloridine ($\epsilon_{255nm} = 1000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), nitrocéfine ($\epsilon_{486nm} = 20500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), céfotaxime ($\epsilon_{260nm} = 7040 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), céfazoline ($\epsilon_{320nm} = 1067 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), céphalothine ($\epsilon_{265nm} = 8790 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), céfuroxime ($\epsilon_{260nm} = 9320 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), ceftazidime ($\epsilon_{265nm} = 10300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), imipenem ($\epsilon_{299nm} = 9000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) et aztreonam ($\epsilon_{320nm} = 700 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) (Rossolini *et coll.*, 1999).

Les vitesses initiales d'hydrolyse en µmol/min/mg sont calculées et les paramètres cinétiques sont déterminés. La valeur de l'activité spécifique est la moyenne de trois mesures \pm SD.

2.9 Effet des inhibiteurs et d'autres substances sur l'activité enzymatique

Les tests d'inhibition sont réalisés en présence de concentrations croissantes de pénicilline G (40 à 600 μM) et de concentrations croissantes d'inhibiteur (Tab. 4). Le volume réactionnel final est de 500 μl dans le tampon phosphate 0,1 M, pH 7. L'enzyme (3 à 9 μg) est préincubée avec la solution d'inhibiteur pendant 10 minutes à 25°C. La réaction est initiée par l'addition de la solution de pénicilline G, puis la diminution de l'absorbance à 235 nm est suivie.

Les vitesses initiales d'hydrolyse en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ sont calculées et les paramètres cinétiques K_I et IC_{50} sont déterminés par la représentation de Hanes-woolf comme décrit dans la partie 2.9. La valeur de l'activité spécifique est la moyenne de trois mesures \pm SD.

Tableau. 4 : Concentrations utilisées dans les tests d'inhibitions

Inhibiteurs	Concentration
Acide clavulanique	0,01-10 μM
Sulbactam	5-35 μM
Tazobactam	0,02-10 μM
EDTA	1-10 mM
NaCl	1-100 mM
Metapnenyl boronate	0-150 μM
Acide borique	0-10 mM

2.10 Effet des flavonoïdes sur l'activité de la β -lactamase

Il s'agit du même protocole décrit dans la partie 2.10. Les inhibiteurs et les concentrations testées sont mentionnés dans le tableau-5.

Tableau. 5 : Concentrations des Flavonoïde utilisées dans les tests d'inhibitions

Flavonoïdes	Concentration (μM)
Rutine Gossypine myricétine Kaempférol	50 μM
Quercétine Quercitrine Catéchine Fisetine flavone Naringénine	100 μM .
Acide gallique Acide caféique Acide ellagique Diosmine Apigénine.	50 μM , 100 μM et 150 μM .

3 Résultats et discussion

3.1 Détermination de la CMI

La détermination des CMI par la méthode « E-test » a montré que la souche *d'E. coli* K18 est résistante à toutes les pénicillines testées (pénicilline G, ampicilline, amoxicilline et pipéracilline) avec des CMI > 256 µg/ml (Tab. 6). Elle est également résistante à la combinaison amoxicilline-clavulanate (CMI = 48 µg/ml). Cependant, la souche reste sensible à la combinaison pipéracilline-tazobactam et aux céphalosporines comme la ceftazidime et la céfotaxime avec des CMI respectivement de 0,25 et 0,023 µg/ml. Elle est également très sensible au méropénème (CMI = 0,008 µg/ml).

Tableau. 6 : Tableau des CMI de la souche *E.coli* K18

β-lactames	CMI (µg/ml)	
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>E. coli</i> K18
Ticarcilline	0,75	> 256
Benzylpénicilline	6	> 256
Ampicilline	0,5	> 256
Amoxicilline	1,5	> 256
Amoxicilline-clavulanate	1	48
Pipéracilline	0,5	> 256
Pipéracilline-tazobactam	0,5	1,5
Ceftazidime	0,094	0,25
Céfotaxime	< 0,016	0,023
Méropénème	0,047	0,008

La résistance à la combinaison amoxicilline-clavulanate chez *E. coli* peut être contrôlée soit par (1) hyperproduction de β-lactamase plasmidique telles TEM-1, TEM-2 et SHV-1 (Wu *et coll.*, 1995) ; (2) hyperproduction d'une céphalosporinase constitutive (AmpC) (Stapleton *et coll.*, 1995) ; (3) production d'enzymes type OXA (Zhou *et coll.*, 1994) ; (4) un déficit des porines OmpF et/ou OmpC (Reguera *et coll.*, 1991) et (5) production d'une β-lactamase TEM résistante aux inhibiteurs (TRI) (Vedel *et coll.*, 1992).

Le profil des susceptibilités obtenu (Tab.6), laisse supposer que la souche étudiée produit une β-lactamase de type TRI. En effet, selon la classification de Bush, ces enzymes appartiennent au groupe 2br et consiste en un ensemble de variants plasmidiques de TEM-1 et TEM-2 avec une faible affinité pour les amino-, carboxy- et uréidopénicillines. Par ailleurs, leurs interactions avec les inhibiteurs suicides comme l'acide clavulanique, le sulbactam et le

tazobactam sont altérées. Les isolats produisant des TRI restent sensibles aux céphalosporines à spectre étroit et étendu, aux céphamycines, carbapénèmes et dans la plupart des cas à la combinaison pipéracilline-tazobactam. De plus, les TRI sont résistantes à la combinaison ampicilline-sulbactam et sont intermédiaires ou résistantes à l'amoxicilline-clavulanate (Cantón *et coll.*, 2008).

L'addition du tazobactam réduit considérablement la CMI de la pipéracilline (1.5 µg/ml) suggérant qu'il pourrait être meilleur inhibiteur que l'acide clavulanique. Selon Bonomo *et coll.* (1997), cette combinaison est la plus efficace pour les TRI, ce qui suggère que la souche d'*E. coli* K18 pourrait produire une β-lactamase de type TRI (Bonomo *et coll.*, 1997 ; Nicolas-Chanoine, 1997).

3.2 Détermination de l'activité spécifique de l'extrait brut

Afin de vérifier si la souche K18 présente un mécanisme par hyperproduction de β-lactamase, nous avons mesuré les activités spécifiques de l'extrait brut en présence de nitrocéfine. Les résultats sont présentés dans le tableau-7. Plusieurs auteurs ont pu établir une relation entre l'activité spécifique et le type de résistance (Wu *et coll.*, 1995 ; Pérez-Moreno *et coll.*, 2004). Wu *et coll.* (1995) ont établi que le mécanisme peut être considéré comme une hyperproduction de TEM-1 si la valeur de l'activité spécifique, mesurée en nmol/min/mg d'extrait brut avec 50 µM de nitrocéfine comme substrat, est supérieure à 200 nmol/min/mg. Dans notre cas, la valeur de l'activité spécifique de l'extrait brut. Cette valeur est inférieure à celle décrite par Wu *et coll.* (1995) (tab.7), ce qui exclue l'hypothèse d'un mécanisme de résistance par hyperproduction de TEM-1.

Cependant, une autre équipe de recherche (Pérez-morino *et coll.*, 2004) a proposé une autre valeur de l'activité spécifique. L'hyperproduction du TEM-1 est définie par une activité spécifique de l'extrait brut supérieure à 58 nmol/min/mg en présence 20 µM de nitrocéfine. Nous avons obtenue une activité spécifique de $127,94 \pm 11.37$. Cette valeur peut suggérer un mécanisme par hyperproduction d'une TEM-1.

Toutefois en se basant sur le profil phénotypique, les résultats correspondent à un mécanisme par production d'une β-lactamase du type TRI.

Tableau. 7 : Activités spécifiques de l'extrait brut d'*E. coli* K18 en présence de nitrocéfine.

Nitrocéfine (μM)	Activité spécifique (nmol/min/mg)
20	$147,45 \pm 6,62$
50	$127,94 \pm 11,37$

3.3 Isolement et purification du β -lactamase

La purification de la β -lactamase est principalement basée sur la méthode décrite par Hedberg *et coll.* (1995). Après une précipitation au sulfate d'ammonium à 80%. Une chromatographie échangeuse d'ion Mono-Q donne le profil décrit dans la Figure-11. Selon le profil d'activité, la β -lactamase est éluée à environ 0,3 M de NaCl. Cependant, une activité résiduelle est également obtenue entre 0,4 et 0,5 M de NaCl. L'analyse par électrophorèse est représentée dans la Figure-12.

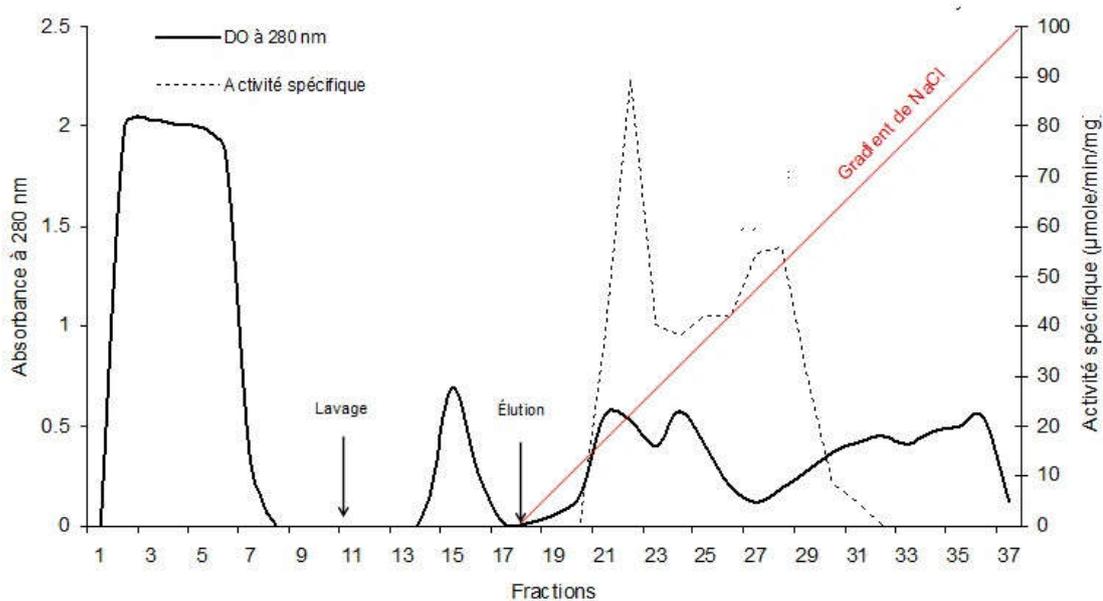


Figure. 11 : Profil de l'absorbance à 280 nm et de l'activité spécifique de β -lactamase obtenus après chromatographie sur une colonne Mono-Q.

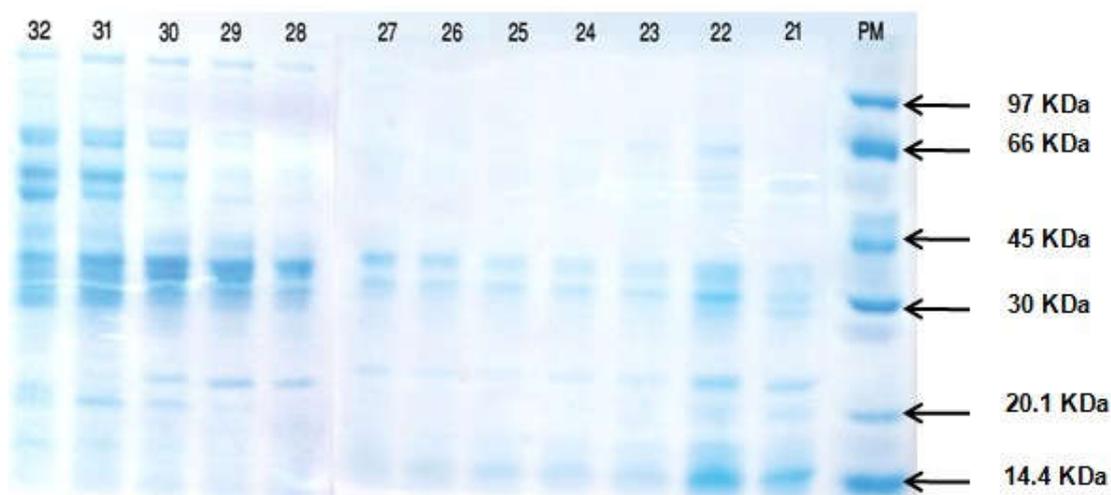


Figure. 12 : Gel d'électrophorèse des fractions éluées de la chromatographie échangeuse d'ions Mono-Q.

Le Tableau-8 présente un bilan récapitulatif des procédures de purification utilisées. Il apparaît que la précipitation au sulfate d'ammonium est suivie d'une grande perte de l'enzyme (47%). L'étape de l'échangeuse d'ion Mono-Q n'engendre pas de perte (rendement = 43%), mais, le facteur de purification est faible (7,2). La fraction enzymatique n'est pas très pure, ce qui est révélé par l'analyse électrophorétique (Fig.13, fractions 21 à 23).

Tableau. 8 : Tableau de purification de la β -lactamase à partir de la souche d'*E. coli* K18.

étapes de purification	Volume (ml)	Concentration des protéines (mg/ml)	Protéines totales (mg)	Activité totale (μ mole/min)	Activité spécifique (μ mole/min/mg)	Facteur de purification	Rendement (%)
Extrait brut	10	9,2	92	635	6,9	1	100
80% sulfate d'ammonium	10	6,5	65	299	4,6	0,7	47,2
Chromatographie sur colonne Mono-Q	20	0,28	5,6	278	49,6	7,2	43,8

Au cours d'une deuxième tentative, nous avons supprimé la précipitation au sulfate d'ammonium afin d'améliorer le rendement de la purification. Les résultats sont représentés dans le Tableau-9. Cette procédure a permis de récupérer deux fois plus d'enzyme (10,8 mg

de protéines) avec un rendement de 56%. Cependant, le facteur de purification reste toujours faible (5,9).

Tableau. 9 : Tableau de purification de la β -lactamase à partir de la souche d'*E. coli* K18 sans l'étape de précipitation au sulfate d'ammonium.

Étapes	Volume (ml)	Protéines (mg/ml)	Protéines totales (mg)	Activité totale (μ mole/min)	Activité spécifique (μ mole/min/mg)	Facteur de purification	Rendement (%)
Extrait brut	20	5,7	114	764	6,7	1	100
Chromatographie échangeuse d'ion	12	0,9	10,8	427	39,5	5,9	56

Le profil d'élution est le gel d'électrophorèse sont représentés, respectivement, dans la Figure-13 et la Figure-14. Il apparaît que l'enzyme n'est toujours pas bien purifiée (Fig.14, fractions 23 et 24), ce qui impose une étape de purification supplémentaire.

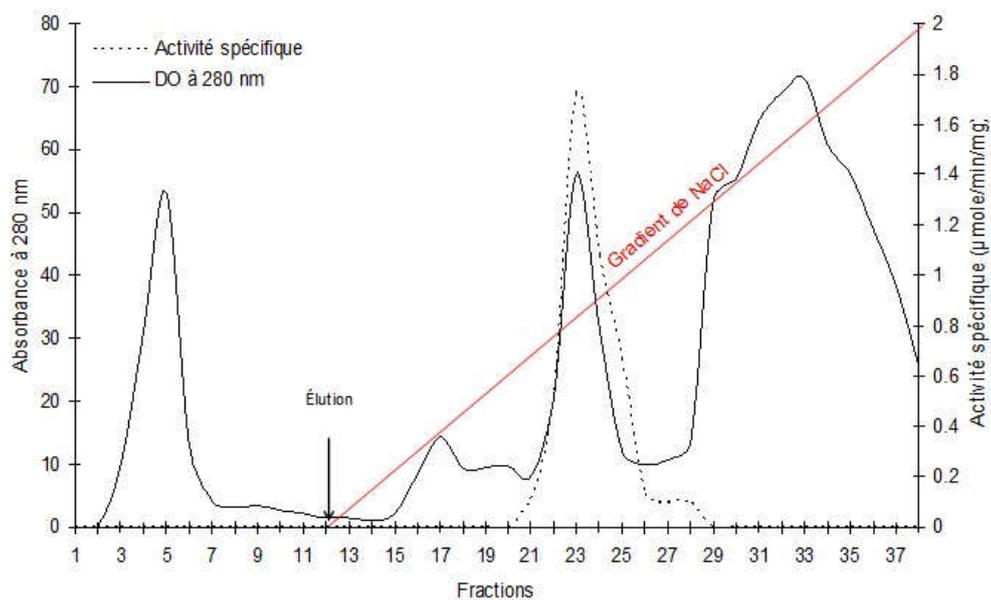


Figure. 13 : Profil de l'absorbance à 280 nm et de l'activité spécifique des différentes fractions de la chromatographie échangeuse d'ion.



Figure. 14 : Gel d'électrophorèse des fractions éluées de la chromatographie échangeuse d'ions sans l'étape de précipitation

Dans la littérature, plusieurs chercheurs utilisent la chromatographie échangeuse d'ion sur un résine de type Mono-Q pour purifier les β -lactamases (Poirel *et coll.*, 2000 ; Girlich *et coll.*, 2004). D'autres chercheurs la combinent avec la filtration sur gel (Caporale *et coll.*, 2004) ; la chromatographie d'affinité (Kernodle *et coll.*, 1999 ; Duval *et coll.*, 2003) ou la chromatographie échangeuse de cations (Vimont *et coll.*, 2002).

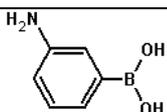
3.3.1 Essai de purification par chromatographie d'affinité

Dans le but d'améliorer la pureté de la β -lactamase, nous avons voulu tester une étape de chromatographie d'affinité sur gel d'agarose-meta-aminophenylborate selon la méthode de Cartwright et Waley (1984) modifié par Kernodle *et coll.* (1990). Afin de vérifier si notre β -lactamase possède une affinité pour le gel d'affinité, nous avons déterminé la constante d'inhibition K_I des deux inhibiteurs : le borate et le meta-aminophenylborate (Tableau-10).

Les constantes K_I sont très élevées : 31,4 mM pour le borate et 335 μ M pour le méta-aminophenylborate. Les inhibitions sont respectivement de type mixte et incompétitif (Annexe 3). Selon Cartwright et Waley (1984), la chromatographie sur gel d'agarose greffé par le méta-aminophenylborate présente une excellente méthode pour purifier certains β -lactamases. Pour une bonne interaction avec le ligand, la β -lactamase doit avoir une bonne affinité ($K_I < 200 \mu$ M). La faible affinité de notre β -lactamase ($K_I < 335 \mu$ M) réduit les

chances de fixation sur le ligand. En effet, l'utilisation de cette étape de chromatographie d'affinité, montre que l'activité de la β -lactamase est récupérée dans la fraction non fixée sur la colonne (Figure-15).

Tableau. 10 : Constantes d'inhibition (K_I) et structures du borate et meta-aminophenylborate

Inhibiteurs	Structures	K_I (mM)
Borate		$31,4 \pm 4,28$
Meta-aminophenylborate		$0,335 \pm 0,015$

Ce résultat n'est pas surprenant puisque Keiner et Waley (1978) ont trouvé que le borate et le metaphenylboronate sont de faibles inhibiteurs d'une β -lactamase de classe A isolée d'une souche de *Bacillus cereus* avec des K_I de 1,2 à 4 mM. Des résultats similaires ont été obtenus par Krendolle *et coll.* (1990) concernant une β -lactamase de classe A, la PC1, qui a un K_I pour le metaphenylboronate de l'ordre de 20 mM. Le borate et ses dérivés sont des inhibiteurs compétitifs très puissants des β -lactamases, spécialement de classe C avec des K_I de l'ordre de nanomolaire (Morandi *et coll.*, 2003). Ces données supportent l'idée que la β -lactamase de la souche d'*E. coli* K18 est de classe A.

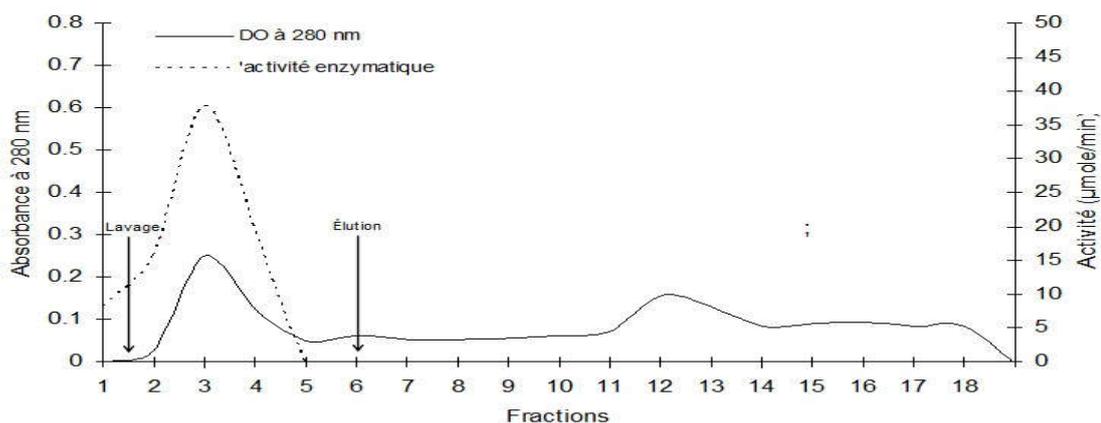


Figure. 15 : Profil de l'absorbance à 280 nm et de l'activité spécifique des différentes fractions de la chromatographie d'affinité.

Plusieurs tampons ont été testés afin d'améliorer éventuellement l'interaction de notre β -lactamase avec le ligand d'affinité : tampon phosphate 0,1 M, pH 7 ; tampon Tris-HCl 20 mM, pH 8 et tampon citrate de sodium 0,02 M, pH 6. Cependant, le même profil a été obtenu indiquant que la β -lactamase n'a aucune affinité pour le gel d'agarose meta-aminophenyl boronate.

Ces résultats nous ont contraints de travailler par la suite des expériences sur la solution enzymatique correspondant aux fractions 23 et 24 (Fig. 14).

3.4 Influence du pH et la température sur l'activité enzymatique

La mesure de l'activité de la β -lactamase en présence de pénicilline G à 200 μ M à différentes températures pendant 10 min montre que notre enzyme est sensible aux variations de température avec un optimum alentours de 37°C à 39°C (Fig. 16). Des résultats similaires ont été obtenus par Lawung *et coll.* (2001) où ils ont caractérisé une β -lactamase à partir d'une souche d'*Haemophilus ducreyi*.

L'étude de l'effet du pH montre que le pH optimum se situe autour du pH 7.0 (Fig. 16). A des pH supérieurs à 8, une diminution de l'activité enzymatique est observée avec une perte de 50% à pH 9. Ces résultats sont compatibles avec ceux rapportés par Livermore et Corkill (1992) qui ont démontré que chez *E. coli* 976 (β -lactamase TEM-1), l'augmentation du pH de 6 à 8 réduit l'activité enzymatique d'un facteur 3.

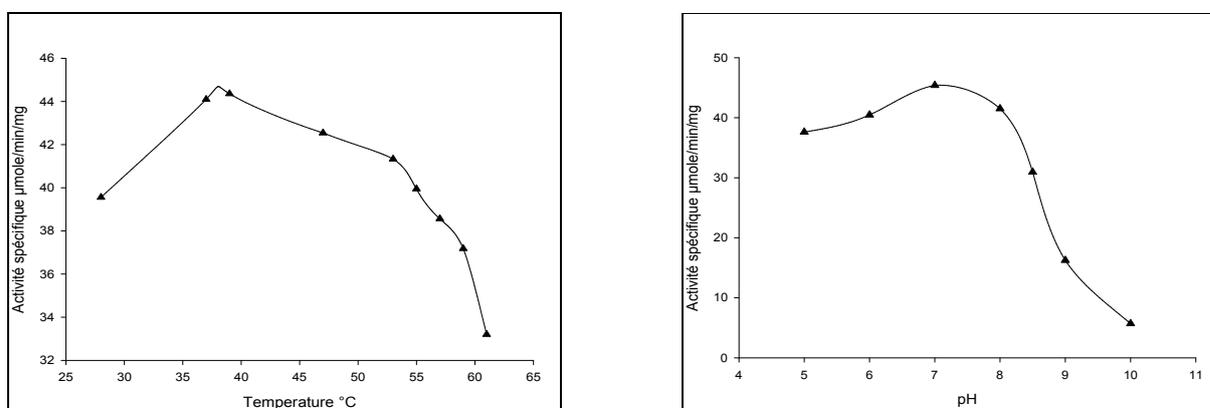


Figure. 16 : Effet de la température et du pH sur l'activité enzymatique de la β -lactamase d'*E. coli* K18.

3.5 Caractérisation biochimique de la β -lactamase d'*E.coli* K18

Les paramètres étudiés pour la caractérisation de la β -lactamase sont l'inhibition par l'acide clavulanique, l'inhibition par l'EDTA, l'inhibition par NaCl, la spécificité de substrat, et la détermination du poids moléculaire et le point isoélectrique. Ce sont ces mêmes paramètres utilisés comme critères de classification des β -lactamases (Bush et coll., 1995).

3.5.1 Poids moléculaire

Le poids moléculaire de la β -lactamase de la souche d'*E. coli* K18 a été déterminé par la méthode d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide suivie par le test iodométrique. La figure-17 montre que la β -lactamase isolée possède un poids moléculaire de 24 KDa, déterminé à partir de la courbe exprimant la mobilité relative en fonction du Log (PM) des protéines standards (Annexe 1). Chez *E. coli*, plusieurs types de TRI qui ont été rapportés dans la littérature ont des poids moléculaires entre 24 et 25 KDa (Buch, 1995 ; Vedel et coll., 1992). Le poids moléculaire de notre β -lactamase est très proche des poids moléculaires décrits suggérant encore que cette enzyme est de type TRI.

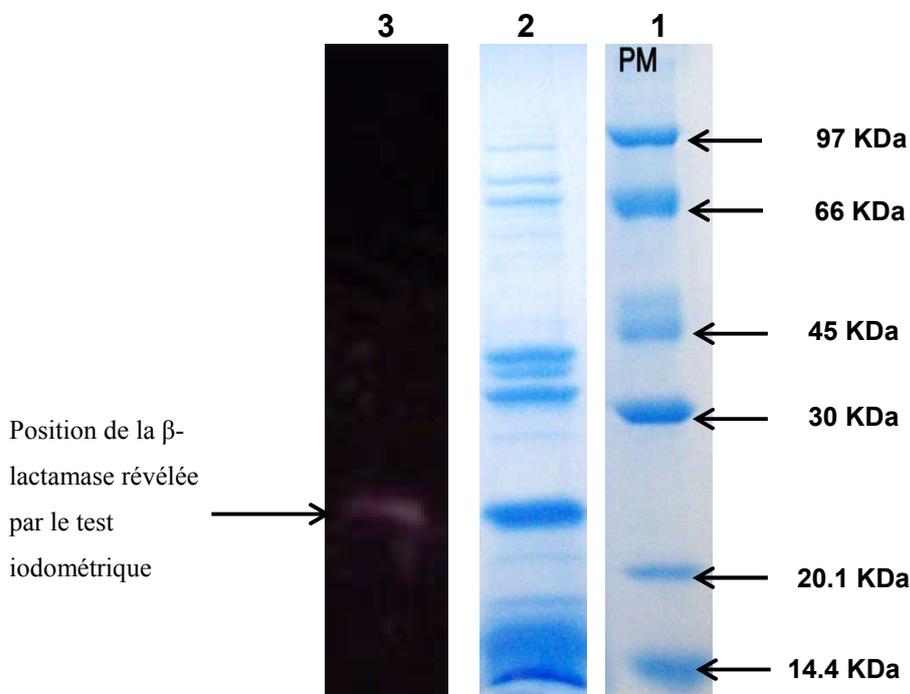


Figure. 17 : Gel d'électrophorèse SDS-PAGE d'une fraction riche en β -lactamase (ligne 2) ; témoin de poids moléculaires (ligne 1) ; gel amidon-agar (ligne 3).

3.5.2 Point isoélectrique

La détermination du point isoélectrique par isoélectrofocalisation montre que le pI de la β -lactamase est égal à 5,2 (Fig.18), ce qui donne une preuve supplémentaire que la β -lactamase de la souche d'*E. coli* K18 est du type TRI. Les points isoélectriques de toutes les TRI isolées jusqu'à ce jour sont de 5,2 ou 5,4 à l'exception du TRI-17 (TEM-59) qui a un pI de 5,6 (Alonso et coll., 2002 ; www.lahey.org/Studies/).

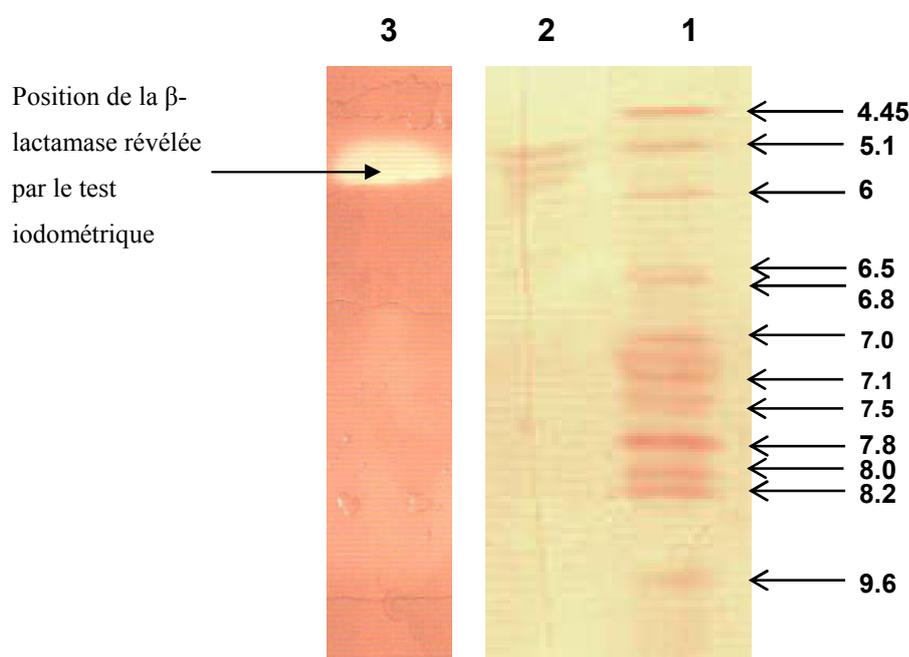


Figure. 18 : Détermination du point isoélectrique (pI) de l'extrait brut (ligne 2) ; Témoin de points isoélectrique; (ligne 1) : gel amidon-agar (ligne 3).

3.5.3 Inhibition par l'EDTA

L'EDTA est un agent chélateur souvent utilisé pour différencier les enzymes de la classe B (classification d'Amblar) constituée de métallo-enzymes (Bebrone, 2007). Les activités de la β -lactamase testées en absence et en présence de 1, 5 et 10 mM d'EDTA sont respectivement $38,65 \pm 1,83$, $37,01 \pm 1,19$, $31,13 \pm 0,89$ et $32,69 \pm 1,46$ $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$. Ces valeurs montrent que l'enzyme n'appartient pas à la classe B.

3.5.4 Inhibition par NaCl

Plusieurs concentrations de NaCl ont été testées. L'enzyme n'est pas inhibée même en présence de 100 mM de NaCl. Ceci suggère que l'enzyme ne dérive pas des enzymes de la classe D. En effet, une des caractéristiques de la plupart des β -lactamases de la classe D est l'inhibition par NaCl qui est due à la présence d'un résidu Tyr dans le motif Tyr144-Gly-Asn. Les β -lactamases OXA ayant le motif Phe-Gly-Asn (OXA-23, OXA-25, OXA-26, OXA-27, OXA-40, OXA-49 et OXA-72) ne sont pas ou faiblement inhibée par NaCl. (Walther-Rasmussen et Høiby, 2006).

3.5.5 Détermination des paramètres cinétiques de la β -lactamase

Afin de déterminer si la β -lactamase est une pénicillinase ou une céphalosporinase et son profil de substrat, nous avons testé l'enzyme avec les substrats suivants : pénicilline G, piperacilline, carbénicilline, cloxacilline, ampicilline, oxacilline, céphaloridine, nitrocéfine, céphalothine, céfuroxime, ceftazidime, céphotaxime, imipenem et aztreonam.

En utilisant la représentation de Lineweaver et Burk ou Hanes-woolf et en testant différentes concentrations de substrat à 28°C et à pH 7,0 (Annexe 4), nous avons déterminé les paramètres cinétiques suivants : constantes de Michaelis et Menten (K_M), les vitesses maximales (V_{max}) et le rapport V_{max}/K_M . Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau-11.

Il apparaît que la β -lactamase d'*E. coli* K18 préfère comme substrat la pénicilline G et la pipéracilline et à plus faible niveau l'ampicilline et carbénicilline. L'hydrolyse de l'oxacilline est difficilement détectable. La cloxacilline n'est pas substrat. Cette enzyme n'hydrolyse pas également les céphalosporines de 2^{ème} et 3^{ème} génération (céfuroxime, céfotaxime et ceftazidime). Cependant, elle hydrolyse faiblement les céphalosporines de 1^{ère} génération (céphaloridine, céphalothine et céfazoline) avec une préférence pour la céphaloridine ($V_{max} = 84,6$) (Tab. 11). Par ailleurs, l'imipenem et l'aztreonam ne sont pas hydrolysés par cette β -lactamase. Selon ces données et en faisant une comparaison avec les paramètres du tableau-1, on peut confirmer clairement que cette enzyme appartient à la classe 2br ou TRI selon la classification de Buch.

Tableau. 11 : Paramètres cinétiques de la β -lactamase d'*E. coli* K18.

Antibiotiques	K_M	V_{max}	V_{max}/K_M
Pénicilline G	141,7 \pm 8,9	129,3 \pm 3,6	0,91
Pipéracilline	100 \pm 9,4	50,3 \pm 2	0,50
Carbénicilline	12,6 \pm 0,5	39,3 \pm 4,6	0,30
Ampicilline	179 \pm 43,9	46,3 \pm 3,6	0,26
Oxacilline	75,9 \pm 10	4,4 \pm 0,2	0,06
cloxacilline	Na	Nh	Na
Céphaloridine	833,3 \pm 50	84,7 \pm 3,5	0,10
céfazoline	468,7 \pm 101,3	53,2 \pm 6,8	0,11
Céphalothine	110 \pm 6,6	4,9 \pm 0,1	0,044
Céfuroxime	Na	Nh	Na
cefuroxime	Na	Nh	Na
cefotaxime	Na	Nh	Na
ceftazidime	Na	Nh	Na
Nitrocéfine	70,2 \pm 12,9	2,8 \pm 0,3	0,039
Aztreonam	Na	Nh	Na
imipenem	Na	Nh	Na

(Na) non applicable, (Nh) non hydrolysable.

A partir de ces résultats, il apparaît que la β -lactamase d'*E. coli* K18 est une pénicillinase et que la pénicilline G est le meilleur substrat pour cette enzyme (le rapport $V_{max}/K_M = 0,91$). Les valeurs des K_M obtenus pour la pénicilline G et la pipéracilline sont, respectivement 4 et 1,5 fois supérieurs aux valeurs de TEM-1 pour les mêmes substrats (Caniça *et coll.*, 1998 ; Delaire *et coll.*, 1992). Pour la céphaloridine et la céphalothine, le K_M est 1 fois inférieur, tandis que pour la nitrocéfine, le K_M est 2 fois supérieur (Tableau-12).

Tableau. 12 : Comparaison entre les K_M de TEM-1 et notre β -lactamase.

Substrats	K_M (μ M)	
	β -lactamase de la souche <i>E. coli</i> K18	TEM-1
Pénicilline G	141,7	36 ^a
Pipéracilline	100	67 ^b
Carbénicilline	12,6	13 ^d
Céphaloridine	833,3	1020 ^b
céphalothine	110	250 ^d
Nitrocéfine	70,2	32 ^c

(a) Delaire *et coll.* (1992) ; (b) Caniça *et coll.* (1998) ; Bonomo *et coll.* (1997) ; (d) Chaïbi *et coll.* (1998).

Bonomo et ses collaborateurs ont montré qu'une souche mutante résistante aux inhibiteurs présente une affinité moindre pour la nitrocéfine par rapport au TEM-1 (Bonomo *et coll.*, 1997). Par ailleurs, selon d'autres auteurs, les efficacités catalytiques (k_{cat}/K_M) des TRI pour les pénicillines sont plus faibles que celles de TEM-1. Les TRI sont relativement actives en hydrolysant les céphalosporines (Yang *et coll.*, 1999). Ceci est dû principalement à la diminution de l'affinité et du k_{cat} (Chaïbi *et coll.*, 1999 ; Cantón *et coll.*, 2008). Nos résultats sont similaires à ceux obtenus par ces auteurs, suggérant que la β -lactamase d'*E. coli* K18 est une enzyme mutante dérivant de TEM et apparentée à une TRI.

3.5.6 Effet de l'acide clavulanique, tazobactam et sulbactam

La mesure de l'activité de la β -lactamase en présence de pénicilline G (200 μ M) et de l'acide clavulanique à différentes concentrations (0,02 à 10 μ M) montre que ce dernier inhibe l'activité enzymatique de manière dose-dépendante. Le pourcentage d'inhibition est déterminé pour chaque concentration de clavulanate. Dans l'intervalle de concentrations de 0,01 à 10 μ M, l'inhibition passe de 13,5 % à 93%. La valeur de l' IC_{50} est égale à 1,05 μ M (Fig. 19a). En présence du tazobactam, l'inhibition est également dose-dépendante. Les pourcentages d'inhibition passent de 7,2% à 89,5% pour des concentrations finales de tazobactam de 0,02 à 0,5 μ M respectivement. La valeur de l' IC_{50} obtenue est égale à 1,7 μ M (Fig. 19b). Pour le sulbactam, les pourcentages d'inhibition passent de 7,1% à 88% pour des concentrations finales de 10 à 35 μ M respectivement. La valeur de l' IC_{50} obtenue est égale à 20,6 μ M (Fig.19c).

Concernant le type d'inhibition, l'inhibition est de type compétitif caractérisée par des constantes d'inhibition K_I de 0,48 μ M, 0,09 μ M et 34,6 μ M, respectivement pour le clavulanate, tazobactam et le sulbactam (Annexe 5 ; Tableau-13).

Tableau. 13 : IC_{50} et K_I de la β -lactamase d'*E. coli* K18 .

Enzyme	Clavulanate		tazobactam		sulbactam	
	IC_{50} (μ M)	K_I (μ M)	IC_{50} (μ M)	K_I (μ M)	IC_{50} (μ M)	K_I (μ M)
β -lactamase d' <i>E. coli</i> K18	1,05 \pm 0,11	0,48 \pm 0,08	1,15 \pm 0,19	0,09 \pm 0,02	20,6 \pm 1,3	34,6 \pm 8
TEM-1	0,08	0,1	0,1	0,01	6,1	0,9

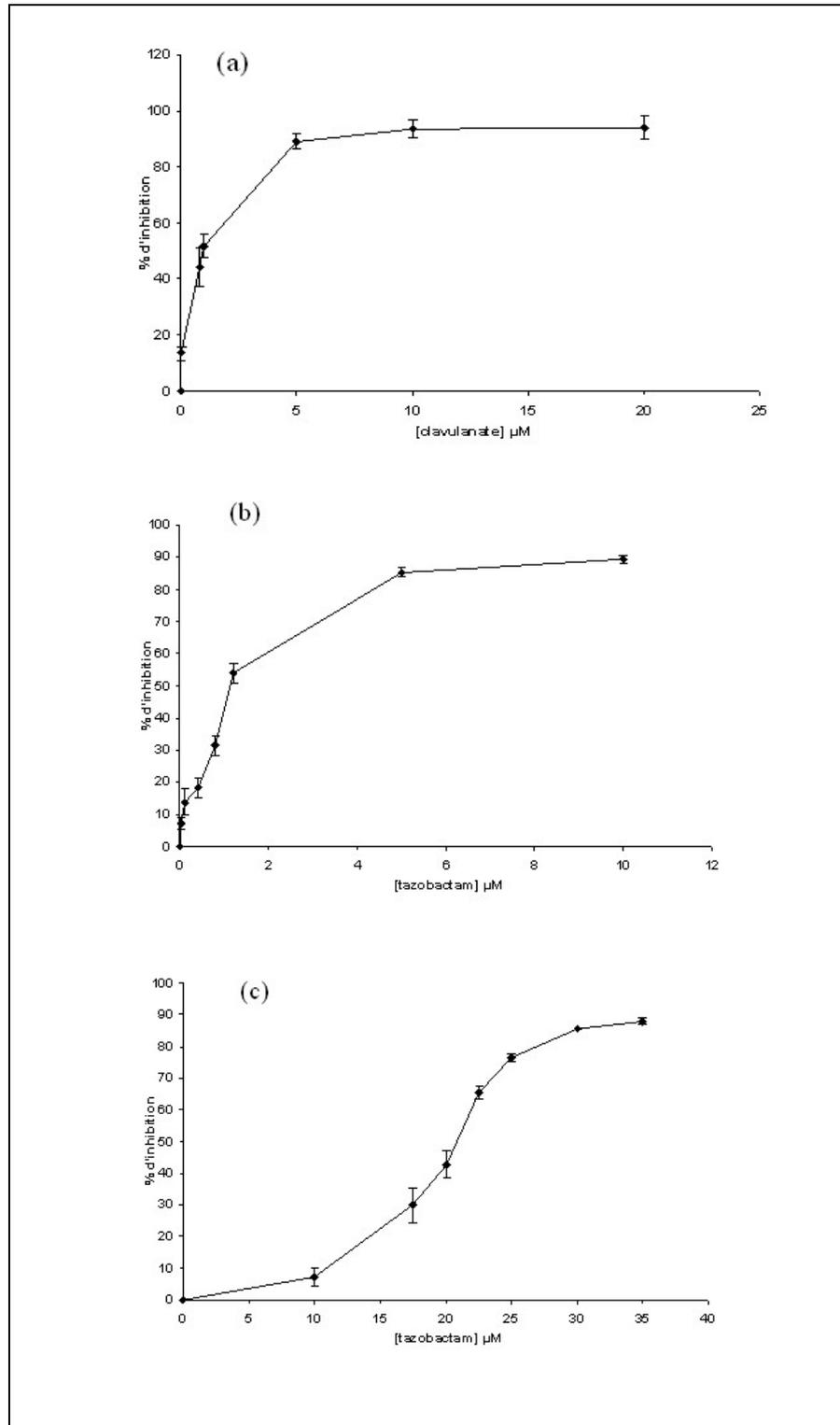


Figure. 19 : Pourcentages d'inhibition de la β -lactamase d'*E. coli* K18 par (a) l'acide clavulanique, (b) le tazobactam et (c) le sulbactam.

Les valeurs des IC_{50} sont 13, 11 et 3 fois supérieures à celles observées avec TEM-1, respectivement pour le clavulanate, tazobactam et sulbactam (Tab.13). A l'opposé de la plupart des β -lactamases TRI isolées, les IC_{50} et K_I de la β -lactamase d'*E. coli* K18 sont très faibles (Chaïbi *et coll.*, 1999). Le sulbactam est un faible inhibiteur pour tout les TRI (les valeurs de l' IC_{50} et K_I sont très élevées). Le clavulanate et le tazobactam ont des effets différents sur les TRI selon qu'elles ont une seule substitution au niveau de la position 69 ou une double substitution 69 et 275 ou 276. En effet, l'acide clavulanique est plus puissant sur les souches produisant des TRI avec une seule substitution (IC_{50} et K_I plus faibles par rapport aux autres TRI), alors que le tazobactam est plus efficace sur celles avec des substitutions doubles (Caniça *et coll.*, 1998 ; Chaïbi *et coll.*, 1999 ; Bonomo *et coll.*, 1997).

Nos résultats sont en accord avec celles obtenues dans la littérature. Les IC_{50} et les K_I sont faibles par rapport aux mutants TRI-1, TRI-2, TRI-10 et TRI-14, mais proches des valeurs des autres IRT avec une seule substitution (IRT-5, IRT-6 et TRI-11) (Yang *et coll.*, 1999 ; Henquell *et coll.*, 1995 ; Stapleton *et coll.*, 1995). Ceci laisse penser que la β -lactamase d'*E. coli* K18 aurait une seule substitution au niveau de la position 69. Selon les différentes caractéristiques des IRT, elle serait très proche de l'IRT-11 (TEM-40) (Chaïbi *et coll.*, 1999) (Tab.14). Cependant, tous ces faits restent uniquement des hypothèses. Il serait très utile d'établir une caractérisation génétique avec une détermination de la séquence du gène *bla* afin de conclure sur l'origine exacte de la β -lactamase d'*E. coli* K18.

Tableau. 14 : Comparaison des IC_{50} et K_I de différents TRI. (Chaïbi *et coll.*, 1999)

β -lactamase	Acide clavulanique		Tazobactam	
	IC_{50} (μ M)	K_I (μ M)	IC_{50} (μ M)	K_I (μ M)
β -lactamase de la souche <i>E. coli</i> K18	1,05	0,48	1,15	0,09
IRT-5(TEM-33)	1,4	1,6	1,9	0,22
IRT-6(TEM-34)	2,45	0,9	1	0,27
IRT-11(TEM-40)	1,3	0,45	0,8	0,14

3.6 Evaluation de l'effet inhibiteur des flavonoïdes

L'objectif de cette partie de notre travail est d'évaluer l'effet inhibiteur d'un certain nombre de flavonoïdes sur la β -lactamase de la souche *E. coli* K18 et d'établir une relation structure-fonction. L'activité enzymatique est testée en présence de 03 concentrations croissantes de chaque flavonoïde. Les pourcentages d'inhibition sont représentés dans le Tableau-15.

Tableau. 15 : Les pourcentages d'inhibition des flavonoïdes

N° Flavonoïdes	% d'inhibition		
	50 μ M	100 μ M	150 μ M
01 Myricétine	18,4	52,6	Nd
02 Gossypine	15,7	37,9	Nd
03 Rutine	15,5	32,2	Nd
04 Catéchine	< 2	28,8	52,5
05 quercétine	< 2	17,5	42,2
06 Kaempférol	21,6	24	Nd
07 Quercitrine	7,3	22,9	55,2
08 Fisetine	< 2	34,3	60,4
09 Naringénine	< 5	15	28,5
10 Flavone	< 5	15,6	24,4
11 Morine	Nd	24	Nd
12 Apigénine	0	0	6,2
13 Diosmine	0	0	0
14 Acide caféique	0	0	0
15 Acide ellagique	0	0	0
16 Acide gallique	0	0	0

(Nd) non déterminé.

D'après ces résultats, nous pouvons tirer les renseignements suivants :

- Les flavonoïdes : diosmine, acide caféique, acide ellagique et acide gallique ne sont pas des inhibiteurs même à des concentrations très élevées (150 μ M).
- La myricétine et la gossypine ont l'effet inhibiteur le plus élevé à 100 μ M avec des pourcentages d'inhibition de 52,6% et 37,9% respectivement.
- Les flavonoïdes : rutine, catéchine, fisetine, quercitrine et Kaempférol ont des taux d'inhibition plus au moins intermédiaires.

- Les flavonoïdes : flavone, naringénine inhibent faiblement l'activité de la β -lactamase. Une concentration de 100 μ M réduit l'activité de la β -lactamase d'environ 15%.
- Les flavonoïdes de la classe flavone (flavone et apigénine) et flavanone (naringénine) sont des inhibiteurs faibles de la β -lactamase.
- Seuls les flavonols et les flavanols ont une capacité à inactiver l'enzyme.

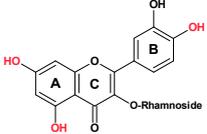
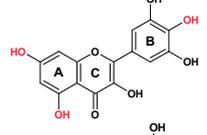
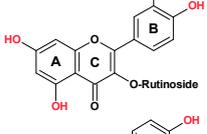
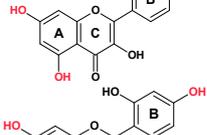
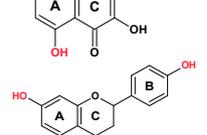
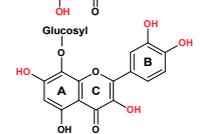
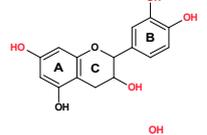
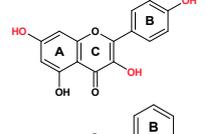
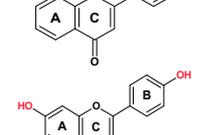
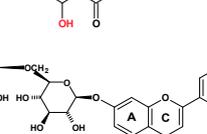
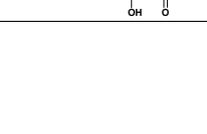
Afin d'établir une relation entre les structures chimiques des flavonoïdes et leur activité inhibitrice, nous avons déterminé le type d'inhibition et la constante d'inhibition (K_I) pour chaque molécule. Les résultats sont présentés dans le Tableau-16.

En comparant ces flavonoïdes avec l'acide clavulanique ou la pénicilline G, on trouve une analogie structurale au niveau du groupement 4 oxo. On peut supposer que cette fonction est essentielle pour l'inhibition. Cette fonction est présente chez l'ensemble des flavonoïdes qui ont un effet inhibiteur. Cependant, la catéchine, qui n'a pas cette fonction, présente un effet plus au moins remarquable.

A l'opposé des inhibiteurs suicides (acide clavulanique, tazobactam et sulbactam) inhibant les β -lactamases de manière compétitive, les flavonoïdes myricétine, quercitrine, naringénine, morine, kaempférol et rutine inhibent la β -lactamase d'*E. coli* K18 de manière non compétitive. Tandis que la fisétine, la flavone, la quercétine, la catéchine et la gossypine sont des inhibiteurs incompétitifs (Annexe 6). Ceci est surprenant vu l'homologie structurale entre toutes ces molécules. La position des hydroxyles (-OH) est sans doute responsable du type d'inhibition. En effet, les flavonoïdes qui sont incompétitifs ont des OH dans les positions C3', C4', C5 et C7, alors que celles qui sont non compétitives ont des OH placés dans les positions C4', C5 et C7. L'hydroxyle en position C3' semble pouvoir à lui seul modifier l'interaction du flavonoïde avec la β -lactamase et ainsi le type d'inhibition.

L'absence du OH en C3' augmente le K_I . C'est le cas du Kaempférol, la naringénine et la morine. D'autre part, l'importance des hydroxyles en positions C5 et C7 dans l'inhibition de la β -lactamase est confirmé par la diosmine qui a un C5 occupé par un glucoside et un OH absent en C7. Cette molécule ne présente aucune activité inhibitrice.

Tableau. 16 : Type d'inhibition et KI des flavonoïdes.

Flavonoïdes	Structure	K_I (μM)	Type d'inhibition
Quercitrine		140 ± 10	Non compétitif
Myricétine		158 ± 10	Non compétitif
Rutine		182 ± 16	Non compétitif
Kaempférol		221 ± 10	Non compétitif
Morine		326 ± 13	Non compétitif
Naringénine		493 ± 40	Non compétitif
Gossypine		92 ± 5	Incompétitif
Catéchine		128 ± 11	Incompétitif
Fisetine		181 ± 16	Incompétitif
quercétine		213 ± 20	Incompétitif
Flavone		410 ± 37	Incompétitif
apigénine		$IC_{50} > 500\mu\text{M}$	
diosmine		Pas d'inhibitions	

La fonction 4-oxo du cycle C a une importance dans l'inhibition. Si on compare la catéchine et la quercétine, le K_I est réduit de moitié. La présence de cette fonction a une importance moindre, puisque son absence augmente l'effet inhibiteur de la catéchine et la quercétine. De plus, la diosmine et l'apigénine possèdent cette fonction et sont incapables d'inhiber la β -lactamase.

D'autres interprétations peuvent être dégagées :

- Le cycle A n'a pas d'influence sur le type d'inhibition.
- En observant l'inhibition de la β -lactamase par la flavone apigénine et son flavonol correspondant Kaempférol, on peut conclure que l'hydroxyle C3 augmente l'effet inhibiteur.
- En comparant les activités de la flavone apigénine et de son analogue flavanone naringénine, on observe que l'absence de la double liaison augmente légèrement l'activité inhibitrice.
- En comparant le flavonol fisétine et le flavonol glycosylé la rutine, on trouve qu'ils ont le même K_I mais ne présentent pas le même type d'inhibition. Au niveau structural, ils diffèrent au niveau C2. Le premier a un OH et le deuxième a un rhamnose.
- Les flavonoïdes interagissent avec la β -lactamase de manière non compétitive. On peut l'expliquer par l'absence des groupements COOH et C=O qui sont présents chez les inhibiteurs suicides classiques ou leurs produits intermédiaires.
- L'acide caféique, l'acide ellagique et l'acide gallique n'ont pas un effet inhibiteur sur le β -lactamase (Fig.20), ce qui suggère que le squelette carboné C6-C3-C6 est important pour l'inhibition.

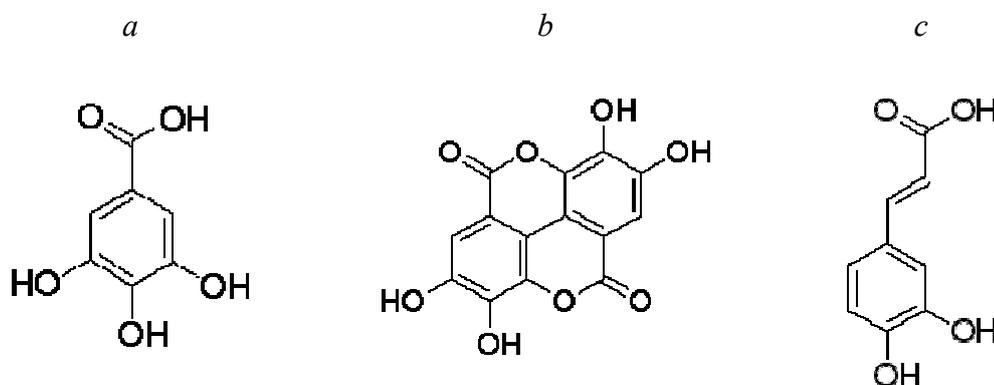


Figure. 20 : Structures chimiques de acide gallique (a), acide ellagique (b) et l'acide caféique (c).

Conclusion générale

L'étude du profil phénotypique de la souche clinique d'*E. coli* 18 nous a permis de montrer qu'elle est résistante aux pénicillines et à l'acide clavulanique. La résistance des bactéries aux inhibiteurs reste aujourd'hui un problème majeur de santé publique. La situation est particulièrement préoccupante en milieu hospitalier où les entérobactéries sont souvent responsables d'infections graves. La pression de sélection exercée par l'utilisation importante des antibiotiques classiques et la diffusion épidémique des souches résistantes sont les deux facteurs principaux conditionnant cette évolution.

Dans le présent travail, nous nous sommes intéressés à la caractérisation phénotypique et biochimique de la souche *E. coli* K18. Cette souche est résistante à l'association acide clavulanique-amoxicilline. L'étude biochimique montre que cette souche produit une pénicillinase de classe A appartenant au groupe 2br selon la classification de Bush (Bush *et coll.*, 1995). Le mécanisme de résistance implique certainement une β -lactamase mutée de type TRI. Le poids moléculaire (24 KDa) et le *pI* (5,2) font penser que cette enzyme serait une TRI-11 isolée précédemment au Royaume Uni (Stapleton *et coll.*, 1995) et en France (Henquelle *et coll.*, 1995). Son isolement en Algérie ne serait pas dû à une mutation aléatoire, mais plutôt à un phénomène de propagation.

L'évaluation de certains flavonoïdes comme alternative aux inhibiteurs classiques, montre une certaine limite. Ces molécules sont faiblement inhibitrices ($K_I > 100 \mu\text{M}$) agissant de manière non compétitive et incompétitive. Cette inhibition est d'une importance clinique moindre car ces flavonoïdes restent beaucoup moins efficaces que l'acide clavulanique.

Les résultats obtenus dans cette étude sur la caractérisation restent préliminaires. Des études complémentaires approfondies peuvent être envisagées et se résument dans les points suivants :

- Travailler sur une solution enzymatique pure. La purification échangeuse d'ion peut être complétée par d'autres étapes comme la filtration sur gel.
- La caractérisation biochimique reste incomplète pour déterminer avec exactitude le type d'enzyme produit par cette souche. Cette étude doit être complétée par des études

de caractérisation génétique qui identifient le gène et éventuellement des substitutions de résidus d'acides aminés dans la structure de l'enzyme.

- Pour obtenir une vue globale sur la relation structure fonction β -lactamase et flavonoïdes, l'étude d'autres flavonoïdes serait très utile.

Références bibliographiques

- Alonso, R., Gerbaud, G., Galimand, M., Courvalin P.** (2002). TEM-103/IRT-28 beta-lactamase, a new TEM variant produced by *Escherichia coli* BM4511. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 46(11): 3627-3629.
- Ambler, R. P.** (1980). The structure of beta-lactamases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol.*, **289**: 321-331.
- Babic, M. A., Hujer, A. M., Bonomo, R. A.** (2006). What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. *Drug Resist. Updates.*, **9**: 142-156.
- Bebrone, C.** (2007). Metallo- β -lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. *Biochem. Pharmacol.*, **74**: 1686-1701.
- Bonomo, R. A., Rice, L. B.** (1999). Inhibitor resistant class A beta-lactamases. *Front Biosci.*, 4: 34-41.
- Bonomo, R. A., Rudin, S. A., Shlaes, D. M.** (1997). Tazobactam is a potent inactivator of selected inhibitor-resistant class A beta-lactamases. *FEMS Microbiol Lett.*, **148**: 59-62.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.
- Bravo, L.** (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.* 11(56):317-339.
- Bush, K.** (1999). β -lactamases of increasing clinical importance. *Curr. Pharm. Design.*, 5: 839-845.
- Bush, K.** (2001). New β -lactamases in gram-negative bacteria. *Antimicrob. Res.*, 32: 1085-1089.
- Bush, K., Jacoby, G. A., Medeiros, A. A.** (1995). A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 39 : 1211-1233.
- Buynak, J. D.** (2006). Understanding the longevity of the β -lactam antibiotics and of antibiotic/ β -lactamase inhibitor combinations. *Biochem. Pharmacol.*, 71: 930-940.
- Canica, M. M., Caroff, N., Barthélémy, M., Labia, R., Krishnamoorthy, R., Paul, G., Dupret, J-M.** (1998) . Phenotypic study of resistance of β -lactamase-inhibitor-resistant TEM enzymes which differ by naturally occurring variations and site-directed substitution at Asp270. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 42: 1323-1328.

- Cantón, R., Morosini, M. I., Martin, O., de la Maza, S., Gomez de la Pedrosa, E. G.** (2008). IRT and CMT β -lactamases and inhibitor resistance. *Clin. Microbiol. Infect.*, 14: 53-62.
- Caporale, B., Franceschini, N., Perilli, M., Segatore, B., Rossolini, G.A., Amicosante, G.** (2004). Biochemical characterization of laboratory mutants of extended-spectrum β -lactamase TEM-60. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 9(49): 3579-3582.
- Cartwright, S.J., Waley, S.G.** (1984). Purification of β -lactamases by affinity chromatography on phenylboronic acid-agarose. *Biochem. J.* 221: 505-512.
- Chaïbi, E. B., Péduzzi, J., Farzaneh, S., Barthélémy, M., Sirot, D., Labia, R.**(1998). Clinical inhibitor-resistant mutants of the beta-lactamase TEM-1 at amino-acid position 69. Kinetic analysis and molecular modelling. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1382(1):38-46.
- Chaïbi, E.B., Sirot, D., Paul, G., Labia, R.** (1999). Inhibitor-resistant TEM beta-lactamases: phenotypic, genetic and biochemical characteristics. *J. Antimicrob. Chemother.*, 43(4): 447-458.
- Chen C. C, Herzberg O.** (2000). Structures of the acyl-enzyme complexes of the *Staphylococcus aureus* beta-lactamase mutant Glu166Asp:Asn170Gln with benzylpenicillin and cephaloridine. *Biochem. J.*, 40(8): 2351-2358.
- Coleman, K.** (2006). Extending the life of β -lactam antibiotics: New β -lactamase inhibitors drug discovery today: therapeutic strategies. *Microb.*, 3(2): 183-188.
- Cos, P., Ying, L., Calomme, M., Hu, J. P., Cimanga, K., Van Poel, B., Pieters, L., Vlietinck, A. V., Berghe, D. K.** (1998) Structure-activity relationship and classification of flavonoïds as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J Nat Prod.*, 61: 71-76.
- Das, S., Rosazza, J. N.** (2006). Microbial and enzymatic transformations of flavonoïds. *J. Nat. Prod.*, 69 (3): 499 -508.
- Delaire, M., Labia, R., Samama, J.-P., Masson, J.-M.** (1992). Site-directed mutagenesis at the active site of *Escherichia coli* TEM-1 β -lactamase. Suicide inhibitor-resistant mutants reveal the role of arginine 244 and methionine 69 in catalysis. *J. Biol. Chem.*, 267: 20600-20606.
- Di Carlo, G., Mascolo, N., Izzo, A.O., Capasso, F.** (1999). Flavonoïds : old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Science.* 65 (4): 337-353.
- Duval, V., Swinnen, M., Lepage, S., Brans, A., Granier, B., Franssen, C., Frère, J-M., Joris, B.** (2003). The kinetic properties of the carboxy terminal domain of the *Bacillus licheniformis* 749/I BlaR penicillin-receptor shed a new light on the derepression of β -lactamase synthesis. *Mol. Microbiol.*, 6(48): 1553-1564.
- Essack, S. A.** (2001). The Development of β -lactam antibiotics in response to the evolution of β -Lactamases. *Pharmaceut. Res.*, 18(10): 1391-1399.
- Finlay, J., Miller, L., Poupard, J. A.** (2003). A review of the antimicrobial activity of clavulanate. *J Antimicrob Chemother.*, 52: 18-23.
- Franklin, J. T., Snow, G.A.** (2005). Biochemistry and molecular biology of antimicrobial drug action . 6^{ème} ed. *Springer.* p.125-200.

- Frère, J.-M.** (1995). β -lactamases and bacterial resistance to antibiotics. *Mol. Microbiol.*, 16: 385-395.
- Girlich, D., Naas, T., Nordmann, P.** (2002). OXA-60, a Chromosomal, inducible, and imipenem-hydrolyzing class D β -lactamase from *Ralstonia pickettii*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 48(11): 4217-4225.
- Golemi, D., Maveyraud, L., Vakullenko, B., Mendelson, J.** (2000). The first structural and mechanistic insights for class D β -lactamases: Evidence for a novel catalytic process for turnover of β -lactam antibiotics. *J. Am. Chem. Soc.*, 122: 6132-6133.
- Havsteen, G. H.** (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids *Pharmacol. Therapeut.*, 96 : 67-202.
- Hedberg, M., Lindqvist, L., Bergman, T., Nord, C. E.** (1995). Purification and characterization of a new β -Lactamase from *Bacteroides uniformis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 39(7): 1458-1461.
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., Bobilya, D. J.** (2002). Flavonoïd antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.*, 13: 572-584.
- Heinz, U., Adolph, H. W.** (2002). Metallo-beta-lactamases: two binding sites for one catalytic metal ion?. *Cell. Mol. Life Sci.*, 61(22): 2827-2839.
- Hendrich, A.B.** (2006). Flavonoïd-membrane interactions: possible consequences for biological effects of some polyphenolic compounds. *Acta Pharmacolo. Sin.*, 27(1): 27-40.
- Henquell, C., Chanal, C., Sirot, D., Labia, R., Sirot, J.** (1995). Molecular characterization of nine different types of mutants among 107 inhibitor-resistant TEM β -lactamases from clinical isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 427-430.
- Hernandez-Valladares, M., Kiefer, M., Heinz, U., Paul-Soto, R., Meyer-Klaucke, W., Nolting, H., Zeppezauer, R., Galleni, M., Frère, J.-M., M., Rossolini, GM., Amicosante, G., Adolph, H-W.** (2000). Kinetic and spectroscopic characterization of native and metal-substituted β -lactamase from *Aeromonas hydrophila* AE036. *FEBS Letters* , 467: 221-225.
- Jacoby, G. A., Mills, D. M., Chow, N.** (2004). Role of β -lactamases and porins in resistance to ertapenem and other β -lactams in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 48(8): 3203-3206.
- Kayser, F. H., Bienz, K. A., Eckert, J., Zinkernagel, R. M.** (2005). The Principles of antibiotic therapy. dans *Medical Microbiology*. 4^{ème} Ed. Thieme Stuttgart, New York. P.187-207.
- Keiner, P.A., Waley, S.G.** (1978). Reversible inhibitors of penicillinases. *Biochem. J.*, 169: 197-204.
- Kernodle, D., Zygmunt, D., McGraw, P., Chihey, J.** (1990). Purification of *Staphylococcus aureus* β -lactamases by using sequential cation-exchange and affinity chromatography. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 34: 2177-2183.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.

- Lamotte-Brasseur, J., Dive, G., Dideberg, O., Charlier, P., Frère, J.-M.** (1991). Mechanism of acyl transfer by the class A serine β -lactamase of *Streptomyces albus* G. *Biochem. J.*, 279: 213-221.
- Landolfi, R., Mower, R. L., Steiner, M.** (1984). Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoïds. Structure-activity relations. *Biochem. Pharmacol.*, 33:1525-1530.
- Lawung, R., Prachayasittikul, V., Bulow, L.** (2001). Purification and characterization of a β -lactamase from *Haemophilus ducreyi* in *Escherichia coli*. *Protein. Expres. Purif.*, 23: 151–158.
- Li, R., Townsend, C.A.** (2006). Rational strain improvement for enhanced clavulanic acid production by genetic engineering of the glycolytic pathway in *Streptomyces clavuligerus*. *Metab. Eng.*, 8: 240-252.
- Livermore D. M.** (1995). β -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.*, 8: 557-584.
- Livermore D. M.** (2001). Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 47: 247-250.
- Livermore, D. M.** (1998). β -Lactamase-mediated resistance and opportunities for its control. *J. Antimicrob. Chemother.*, 41: 25-41.
- Livermore, D. M., Corkill, J. E.** (1992). Effects of CO₂ and pH on inhibition of TEM-1 and other β -lactamases by penicillanic acid sulfones. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 37(11): 1870-1876.
- Lynch, A. S.** (2006). Efflux systems in bacterial pathogens: An opportunity for therapeutic intervention? An industry view. *Biochem. pharmacol.*, 71: 949-956.
- Macart, M., Gerbaut, L.** (1982). An improvement of the coomassie blue dye binding method allowing an equal sensitivity to various proteins application to cerebrospinal fluid. *Clin. Chem. Acta.*, 122: 93-101.
- Maiti, S. N., Kamalesh Babu R. P., Shan, R.** (2006). Overcoming bacterial resistance: role of β -lactamase inhibitors. *Springer-Verlag*. Berlin. P.208-215.
- Manthey, J. M.** (2000). Biological properties of flavonoïds pertaining to inflammation. *Microcirc.*, 7: S28-S34.
- Massova, I., Mobashery, S.** (1998). Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 42: 1-17.
- Matagne A, Frère J-M.** (1995). Contribution of mutant analysis to the understanding of enzyme catalysis: the case of class A beta-lactamases. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1246(2): 109-127.
- Matagne, A., Dubus, A., Galleni, M., Frère, J-M.** (1999). The β -lactamase cycle: a tale of selective pressure and bacterial ingenuity. *Nat. Prod. Rep.*, 16: 1-19.
- Middleton, E., Chithan Kandaswami, J. R., Theoharides, T. C.** (2000). The effects of plant flavonoïds on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol. Rev.*, 52:673–751.

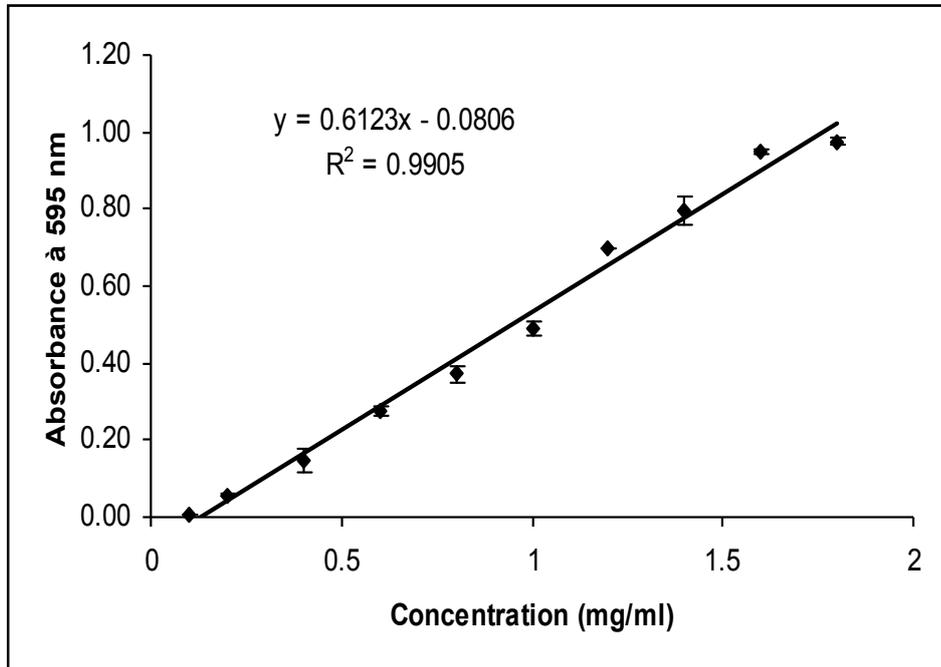
- Minasov, G., Wang, H., Shoichet, B. K.** (2002). An ultrahigh resolution structure of TEM-1 β -lactamase suggests a role for Glu166 as the general base in acylation. *J. Am. Chem. Soc.*, 124 (19): 5333-5340.
- Monnaie, D., Frère, J.-M.** (1993). Interaction of clavulanate with class C β -lactamases. *FEBS*, 334: 269-271.
- Morandi, F., Caselli, E., Morandi, S., Focia, P.G., Blázquez, J., Shoichet, B.K., Prati, F.** (2003). Nanomolar inhibitors of AmpC β -Lactamase. *J. Am. Chem. Soc.*, 125 : 685-695.
- Nicolas-Chanoine M. H.** (1997). Inhibitor-resistant β -lactamases. *J. Antimicrob. Chemother.*, 40: 1-3.
- Nikaido H.** (2001). Preventing drug access to targets: cell surface permeability barriers and active efflux in bacteria. *Dev. Biol.*, 12: 215–223.
- Padayatti, P. S., Helfand, M. S., Totir, M. A., Carey, M. P., Carey, P. R., Bonomo, R. A., Van den Akker, F.** (2005). High Resolution Crystal Structures of the trans-Enamine Intermediates Formed by Sulbactam and Clavulanic Acid and E166A SHV-1 β -Lactamase. *J. Biol. Chem.*, 280(41): 34900-34907.
- Pérez-Moreno, M. O., Pérez-Moreno, M., Carulla, M., Rubio, C., Jardí, A. M., Zaragoza, J.** (2004). Mechanisms of reduced susceptibility to amoxicillin–clavulanic acid in *Escherichia coli* strains from the health region of Tortosa (Catalonia, Spain). *Eur. J. Clin. Microbiol.*, 10: 234-241.
- Philippon, A., Dusart, J., Joris, B., Frère, J.-M.** (1998). The diversity, structure and regulation of β -lactamases. *CMLS. Cell. Mol. Life Sci.*, 54: 341-346.
- Pietta, P.-G.** (2000). Flavonoïds as antioxidants. *Nat. Prod.*, 63(7): 1035-1042.
- Plaper, A., Golob, M., Hafner, I., Oblak, M., Šolmajer, T., Jerala, R.** (2003). Characterization of quercetin binding site on DNA gyrase. *Biochem. Bioph. Res. Co.*, 306: 530-536.
- Ploy, M. C., Lambert, T., Gassama, A., Denis, F.** (2000). Place des intégrons dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques. *Ann. Biol. Clin-Paris.* 58(4): 439-444.
- Poirel, L., Nordmann, P.** (2002). Acquired Carbapenem-Hydrolyzing Beta-Lactamases and their Genetic Support. *Curr. Pharm. I Biot.*, 3: 117-127.
- Poirel, L., Thomas, I., Naas, T., Karim, A., Nordmann, P.** (2000). Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum β -lactamase, and the class 1 Integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 44(3): 622-632.
- Poole, K.** (2005). Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J. Antimicrob. Chemother.*, 56: 20-51.
- Reading, C., Cole, M.** (1977). Clavulanic Acid: a Beta-Lactamase-Inhibiting Beta-Lactam from *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob Agents Chemother.*, 11(5): 852–857.
- Reguera, J. A., Baquero, F., Pérez-Díaz, J. C., Martínez, J. L.** (1991). Factors determining resistance to β -lactam combined with β -lactamase inhibitors in *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 27 : 569-575.

- Richmond, M. H., Sykes, R. B.** (1973). The β -lactamases of Gram-negative bacteria and their possible physiological role. *Adv. Microb. Physiol.*, **9**: 31-88.
- Rossolini, G. M., Franceschini, N., Lauretti, L., Caravelli, B., Riccio, M.L., Galleni, M., Frère, J-M., Amicosante, G.** (1999). Cloning of a *Chryseobacterium (Flavobacterium) meningosepticum* Chromosomal Gene (blaACME) encoding an extended-spectrum class A β -lactamase related to the *Bacteroides* cephalosporinases and the VEB-1 and PER β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **43**(9): 2193–2199
- Sandanayaka, V. P., Prashad, A. S.** (2002). Resistance to β -Lactam Antibiotics: Structure and Mechanism Based Design of β -Lactamase Inhibitors. *Curr. Med. Chem.*, **9**: 1145-1165.
- Stapleton, P., Wu, P G., King, A., Shannon, K., Frenc, G., Phillips, L.** (1995). Incidences and mechanisms of resistance to the combination of amoxicillin and clavulanic acid in *Eschrichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **39**: 2478-2483.
- Sykes, R B., Matthew, M.** (1976). The β -lactamases of gram negative bacteria and their role in resistance to β -lactam antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.*, **2**: 115-157.
- Tandé, D.** (2005). Mécanisme d'action et de résistance des antibiotiques. Dans Gaudy, C., Buxeraud, J. éditeurs. Antibiotiques : pharmacologie et thérapeutique. France : Elsevier Masson. P 21-29.[cité le 23 avril 2008] ;disponible dans : <http://books.google.fr/books?id=IUSEZVUTLy0C>.
- Therrien, C., Levesque, R. C.** (2000). Molecular basis of antibiotic resistance and β -lactamase inhibition by mechanism-based inactivators: perspectives and future directions. *FEMS. Microbiol. Lett.* **24**: 251-262.
- Thomson, C. G., Amyes, S. G.** (1992). TRC-1: emergence of a clavulanic acid-resistant β -lactamase in a clinical strain. *FEMS. Microbiol. Lett.*, **70**: 113-117.
- Thomson, K. S., Moland, E. S.** (2000). Version 2000: the new β -lactamases of gram-negative bacteria at the dawn of the new millennium. *Microbes Infect.*, **2**: 1225-1235.
- Tim Cushnie, T. P., Lamb, A. J.** (2005). Antimicrobial activity of flavonoïds. *Int. J. Antimicrob. Ag.*, **26**: 343-356.
- Vedel, G., Belaouaj, A., Gilly, L., Labia, R., Philippon, A., Nénot, P., Paul, G.** (1992). Clinical isolates of *Escherichia coli* producing TRI β -lactamases: novel TEM enzymes conferring resistance to β -lactamase inhibitors. *J. Antimicrob. Chemother.*, **30**: 449.
- Vimont, S., Poirel, L., Naas, T., Nordmann, P.** (2002). Identification of a chromosome-borne expanded-spectrum class A β -Lactamase from *Erwinia persicina*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **46**(11): 3401-3405.
- Walther-Rasmussen, J., Høiby, N.** (2006). OXA-type carbapenemases. *J. Antimicrob. Chemother.*, **57**: 373–383.

- Wilke, M. S., Lovering, A. L., Strynadka N.** (2005). β -Lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Curr. Opin. Microbiol.*, **8**: 525-533
- Wu, P. J., Shannon, K., Phillips, I.** (1995). Mechanisms of hyperproduction of TEM-1 β -actamase by clinical isolates of *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* **36**: 927-939.
- Yang, Y., Rasmussen, B.A., Shlaes, D. M.** (1999). Class A β -lactamases-enzyme-inhibitor interactions and resistance. *Pharmacol. Therapeut.*, **83**: 141-151.
- Yang, Y., Rasmussen, B.A., Shlaes, D.M.** (1999). Class A β -lactamases enzyme-inhibitor interactions and resistance. *Pharmacol & Therapeut.*, **83**: 141-151.
- Yao, L. H., Jiang, Y. M., Shi, J., Toma S-Barbera, F. A., Datta, N. N., Singanusong, R., Chen, S. S.** (2004). Flavonoïde in food and their health benefits. *Plant Foods Hum. Nutr.*, **59**: 113-122.
- Yoneyama, H., Katsumata, R.** (2006). Antibiotic resistance in bacteria and Its future for novel antibiotic development. *Biosci. Biotech. Bioch.*, **70**(5): 1060-1075.
- Zhou, X. Y., Bordon, F., Siro, D., Kitzis, M. D., Gutmann, L.** (1994). Emergence of clinical isolates of *Escherichia coli* producing TEM-1 derivatives or an OXA-1 β -lactamase conferring resistance to β -lactamase inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **38**: 1085-1089.

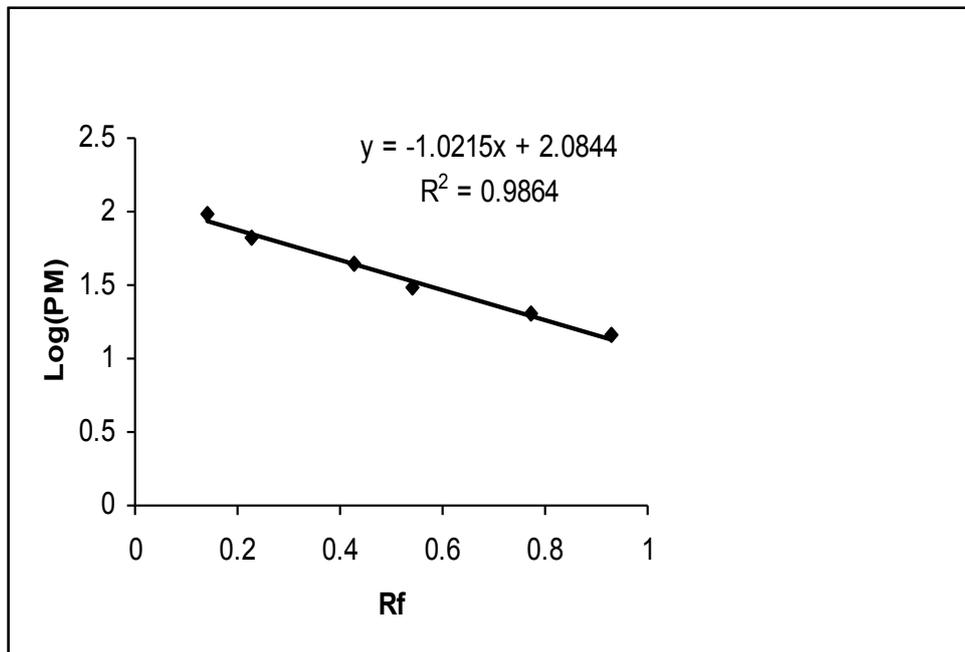
Annexes

Annexe 1



Droite d'étalonnage de la BSA (moyenne \pm SD de trois mesures).

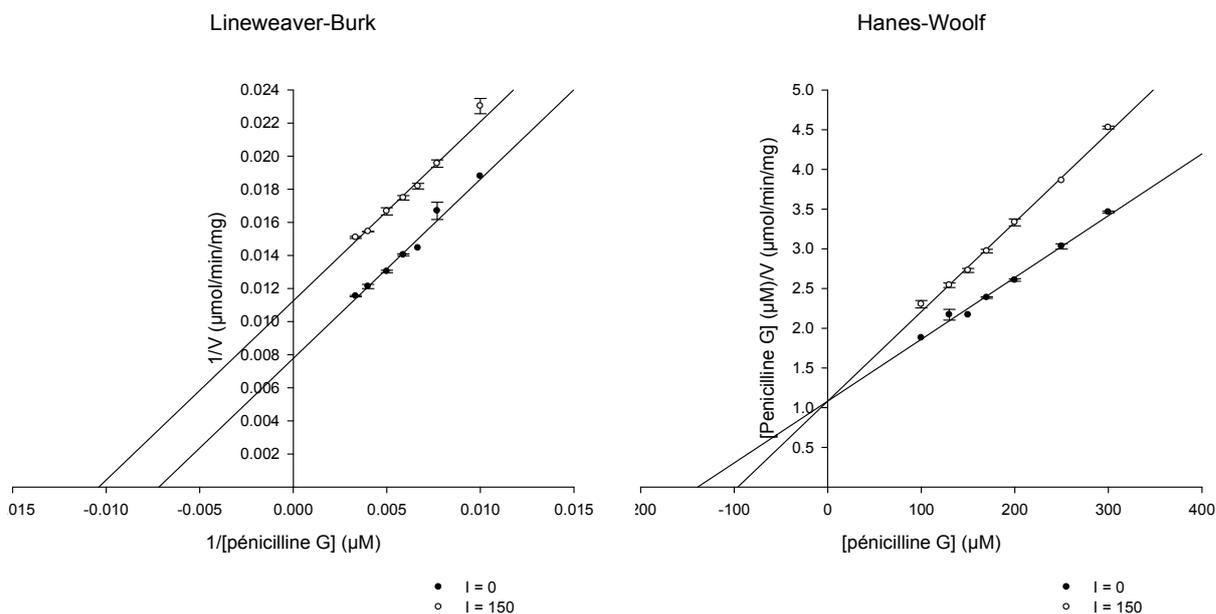
Annexe 2



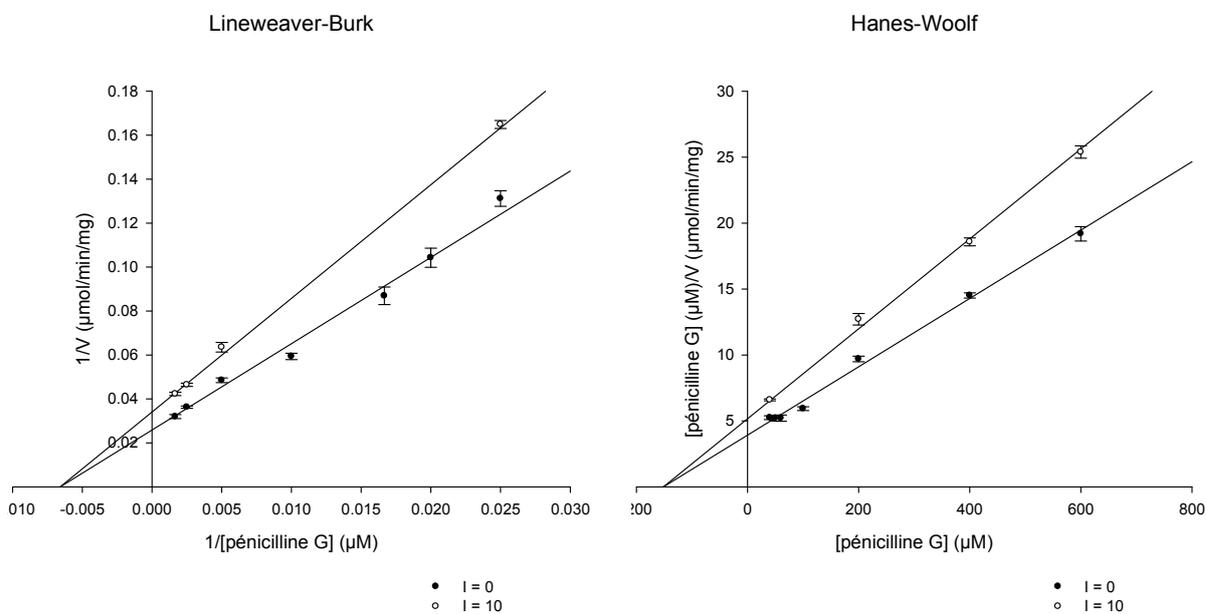
Mobilité électrophorétique en fonction du PM.

$$\text{Mobilité relative} = \frac{\text{Distance parcourue par les protéines}}{\text{Distance du front de migration}}$$

Annexe 3

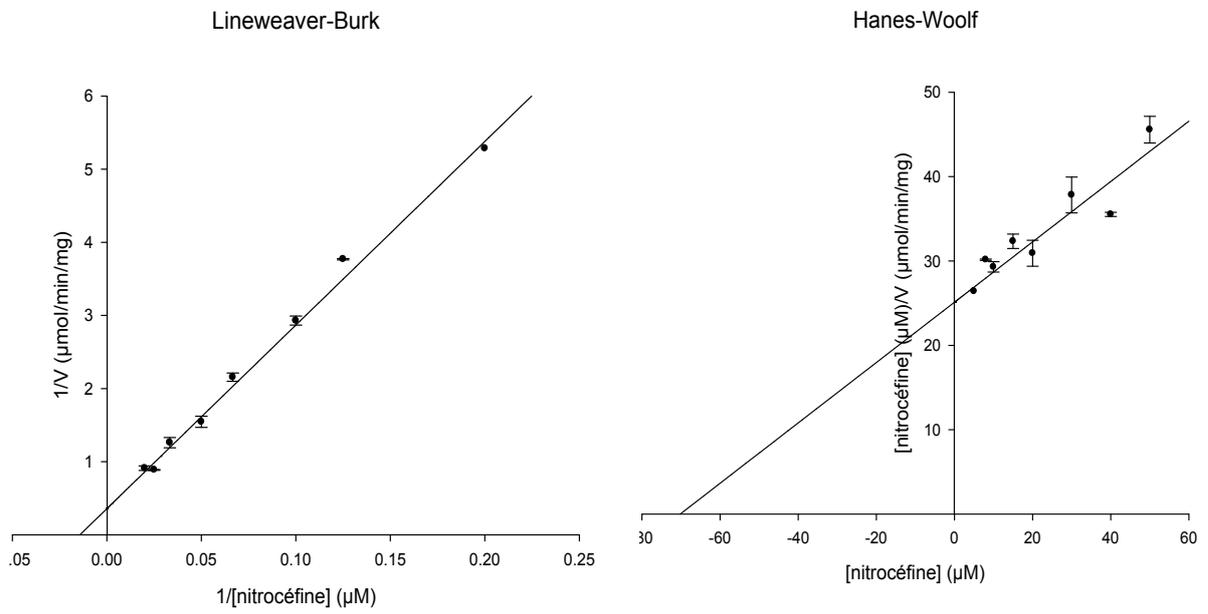


Représentation de Lineweaver-Burk et Hanes-wolf en présence et en absence de metaphenyl boronate

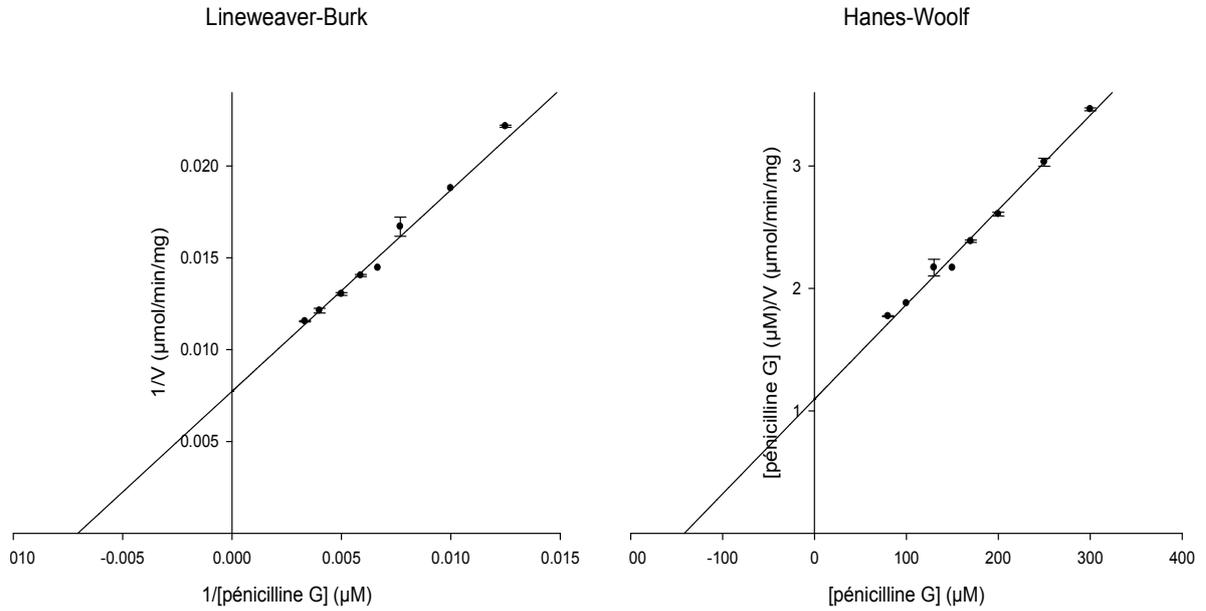


Représentation de Lineweaver-Burk et Hanes-wolf en présence et en absence de l'acide borique

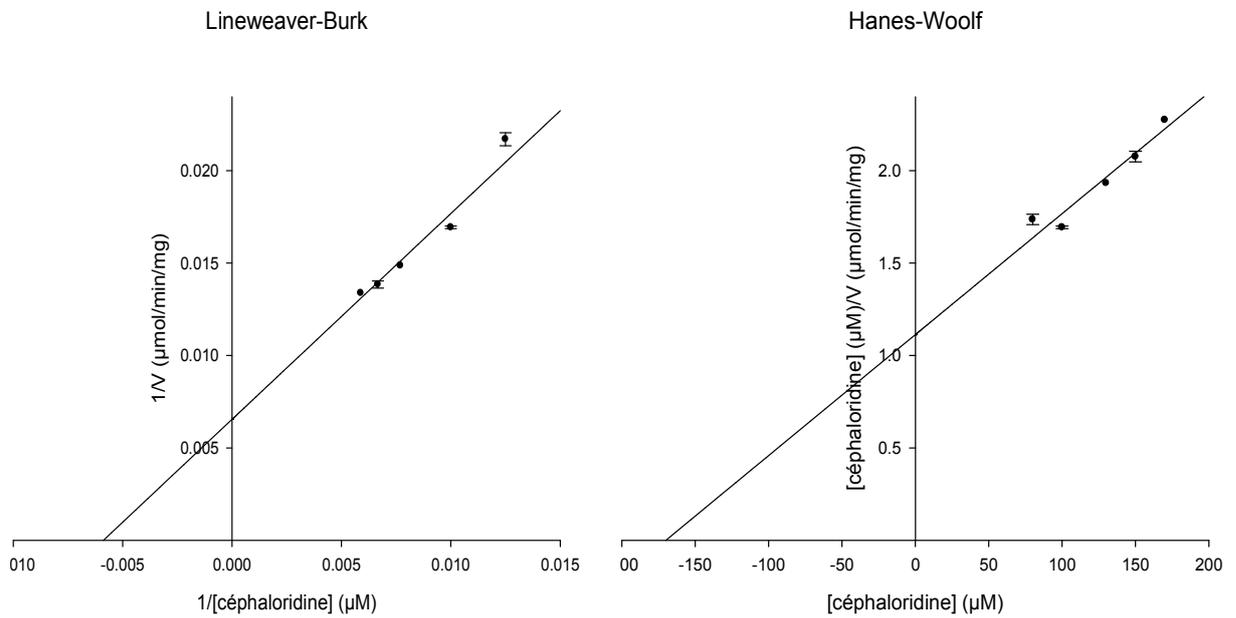
Annexe 4



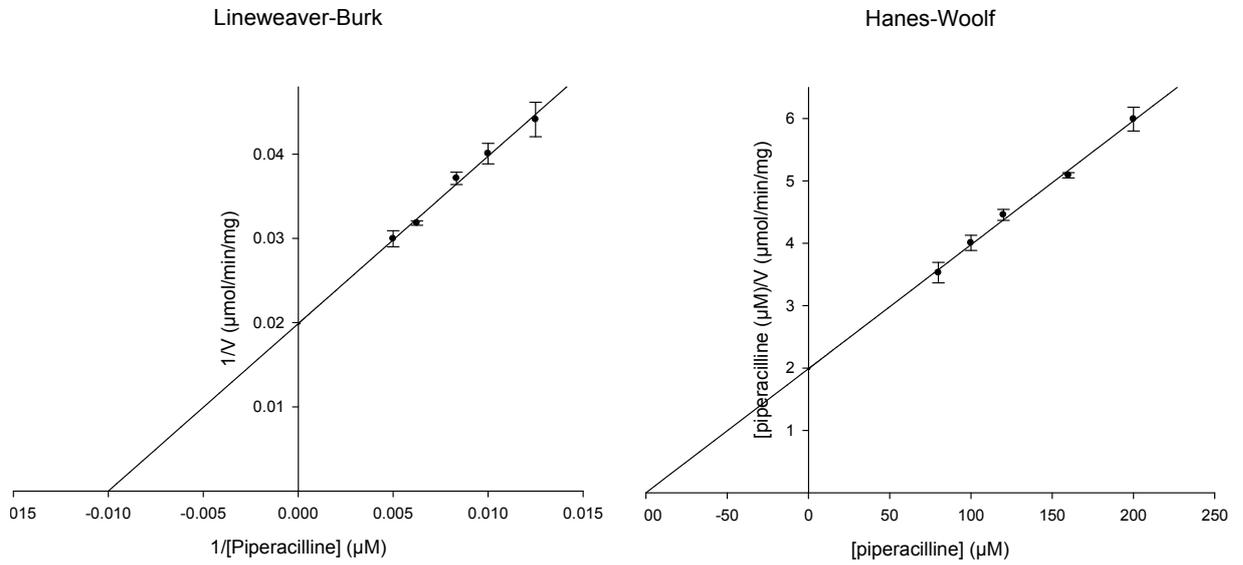
Représentations de Lineweaver-Burk, Hanes-wolf de la β -lactamase avec la nitrocéfine comme substrats.



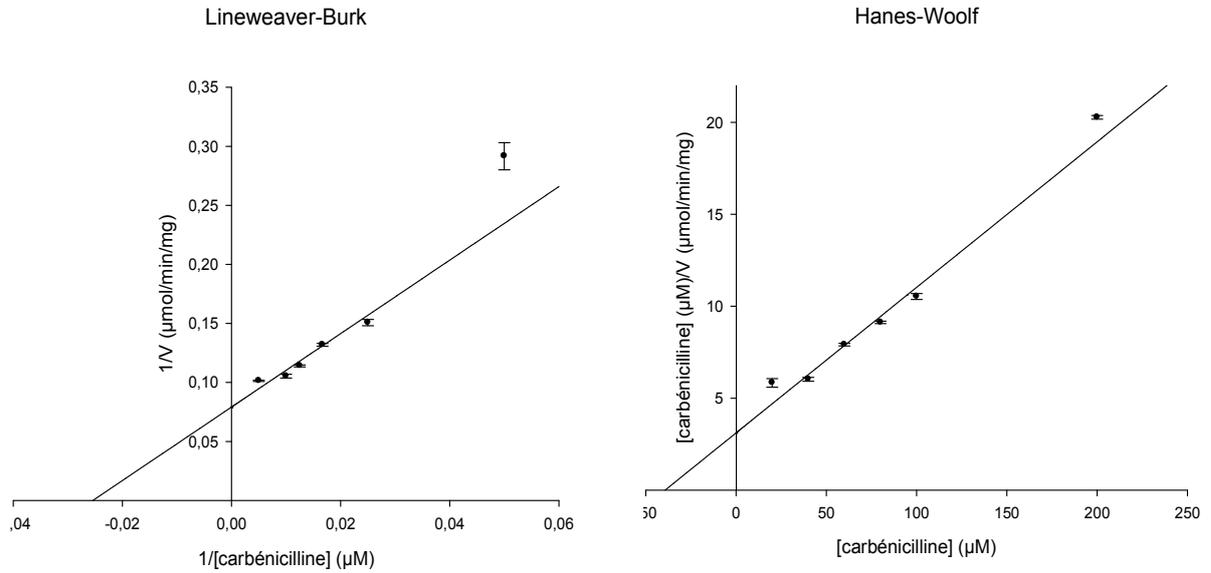
Représentations de Lineweaver-Burk, Hanes-wolf de la β -lactamase avec la pénicilline G comme substrats.



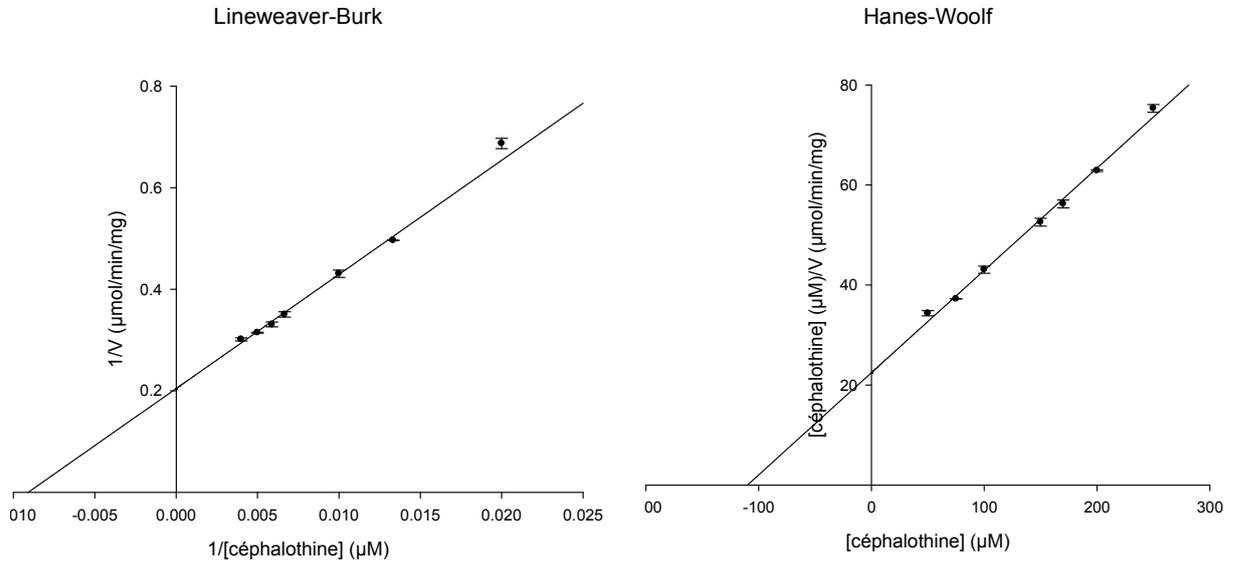
Représentations de Lineweaver-Burk, Hanes-wolf de la β -lactamase avec la céphaloridine comme substrats.



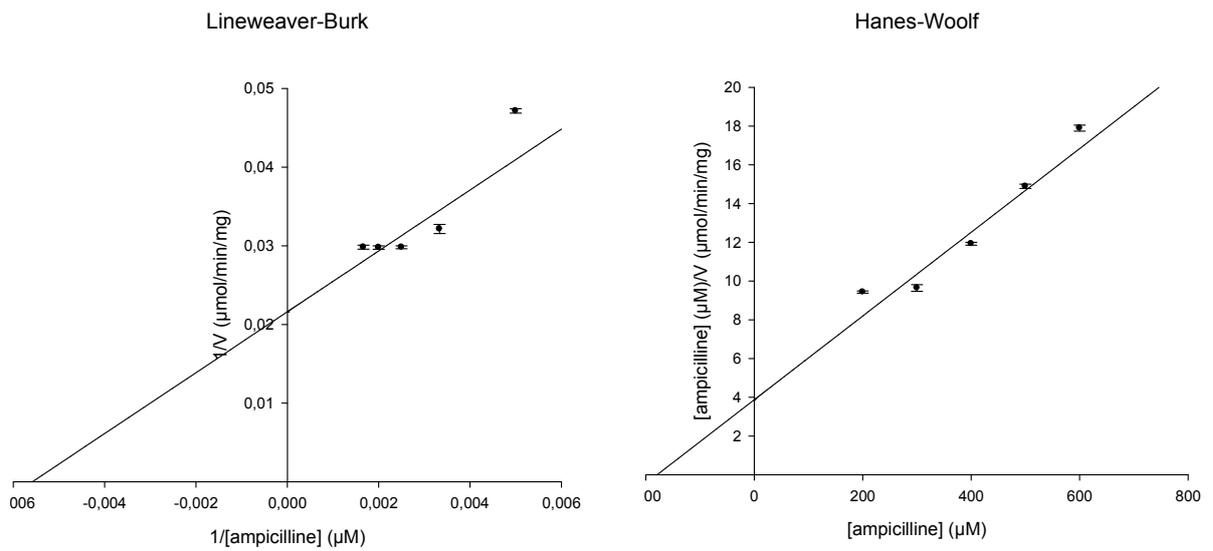
Représentations de Lineweaver-Burk, Hanes-wolf de la β -lactamase avec la piperacilline comme substrat.



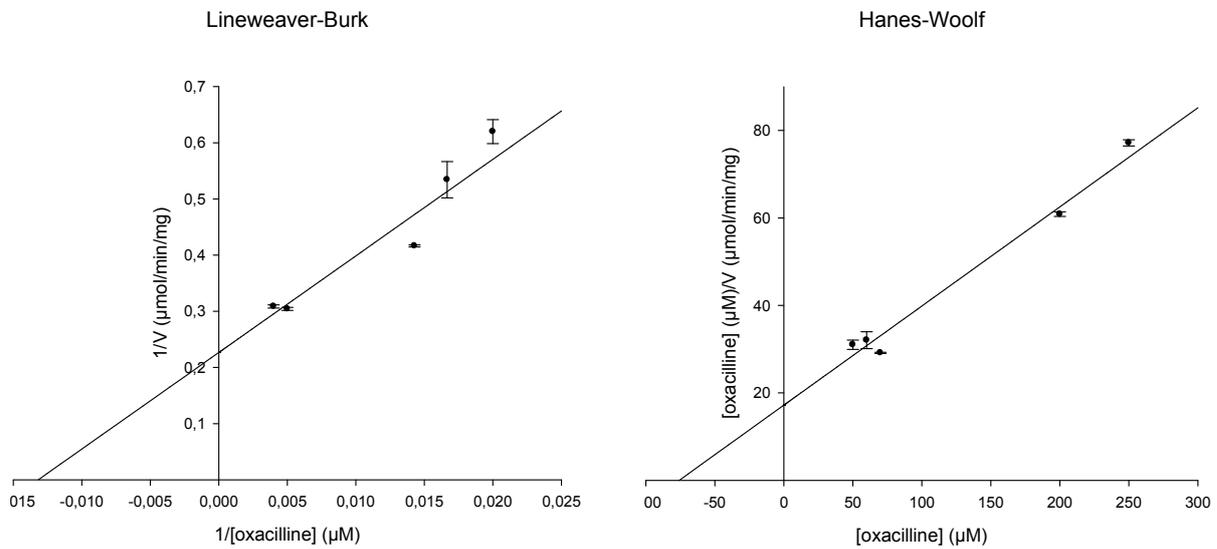
Représentations de Lineweaver-Burk, Hanes-wolf de la β -lactamase avec la carbénicilline comme substrat.



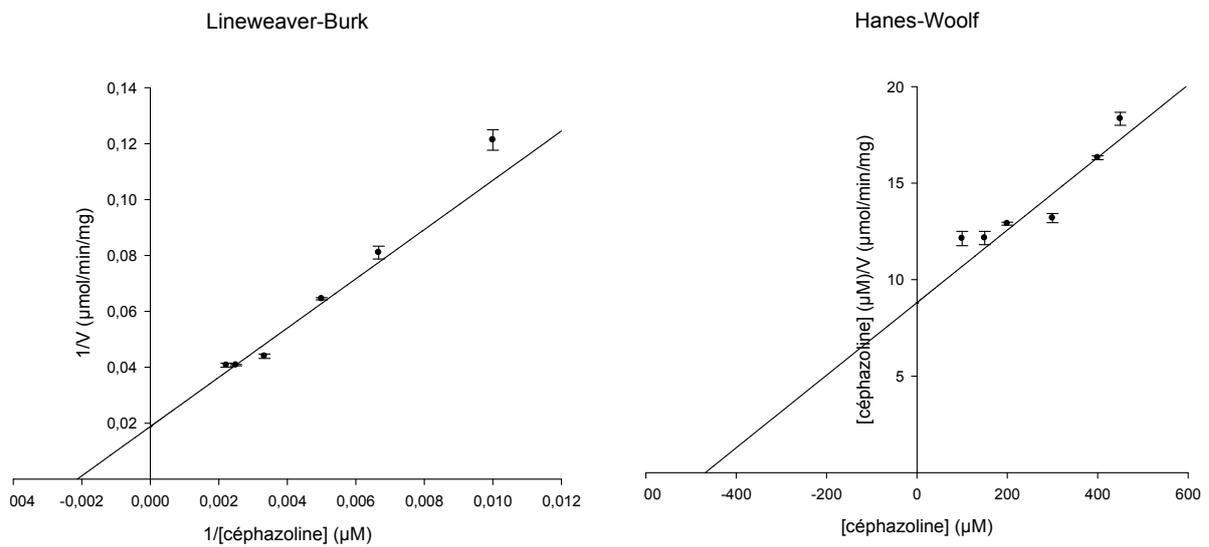
Représentations de Lineweaver-Burk, Hanes-wolf de la β -lactamase avec la céphalothine comme substrat.



Représentations de Lineweaver-Burk, Hanes-wolf de la β -lactamase avec la ampicilline comme substrat.

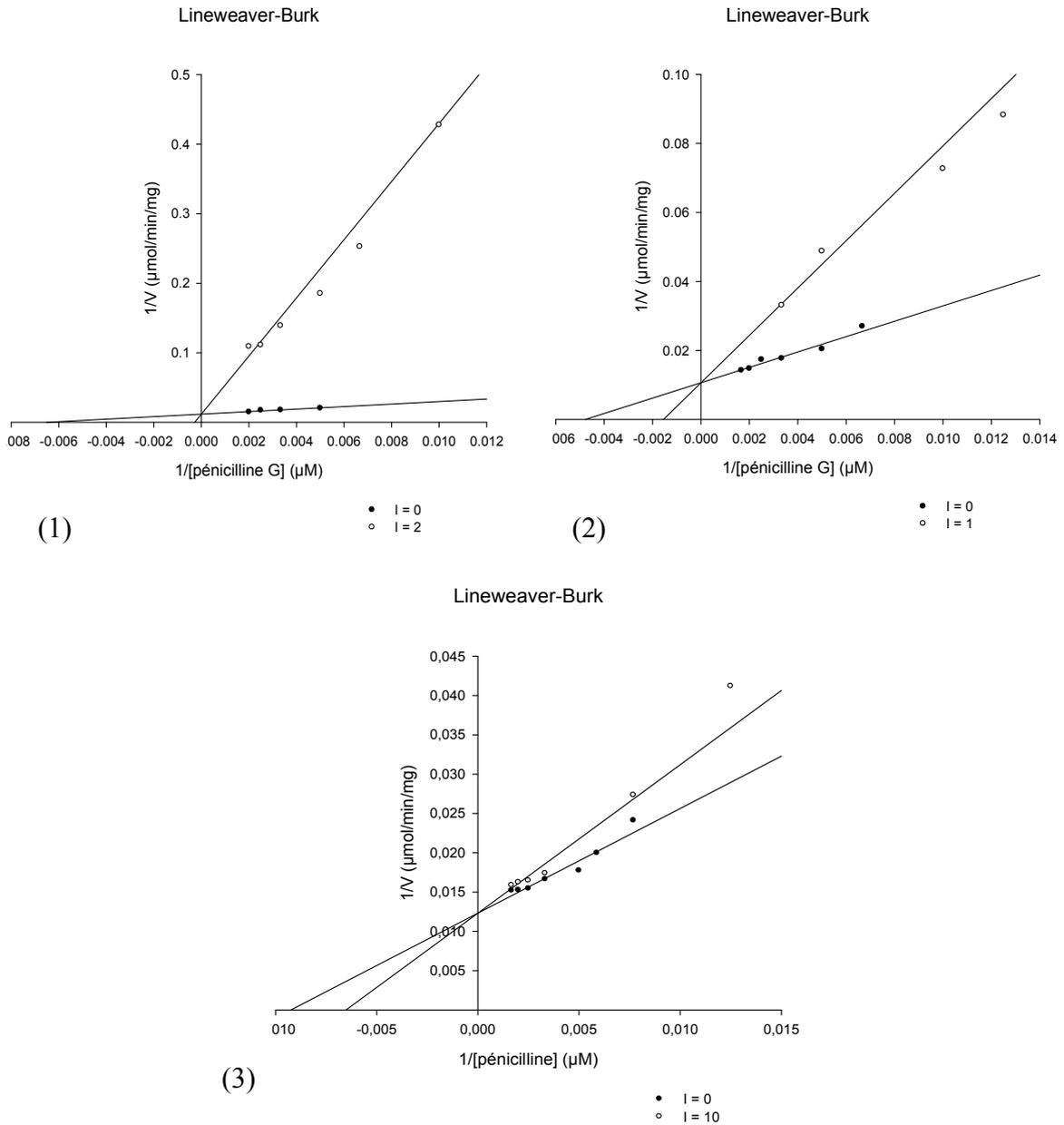


Représentations de Lineweaver-Burk, Hanes-wolf de la β -lactamase avec la oxacilline comme substrat.



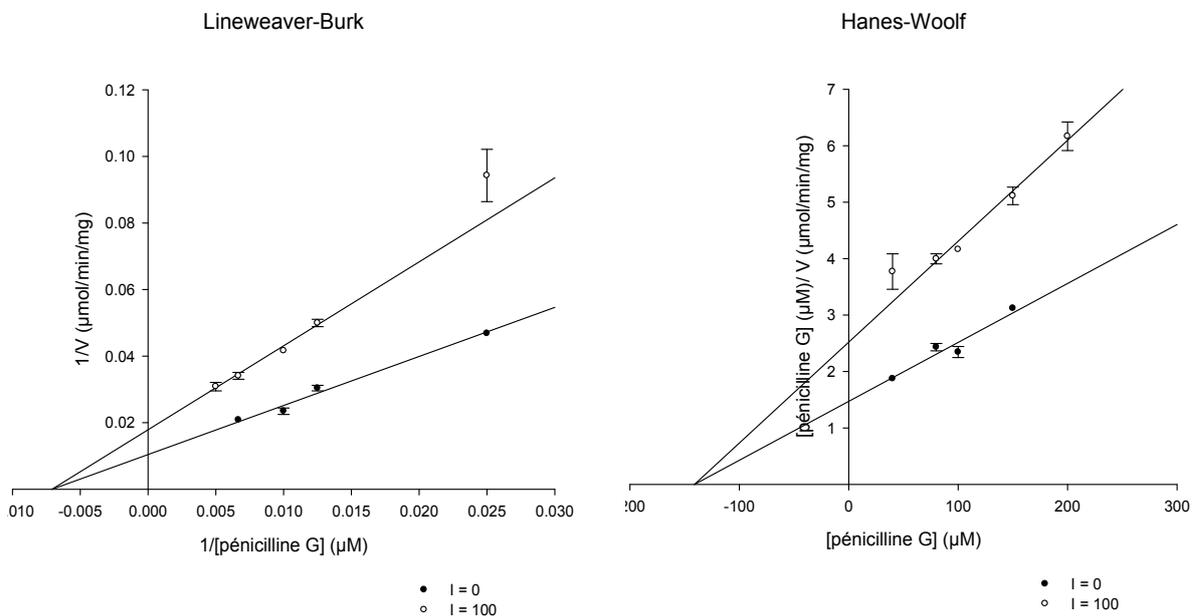
Représentations de Lineweaver-Burk, Hanes-wolf de la β -lactamase avec la céphazoline comme substrat.

Annexe 5

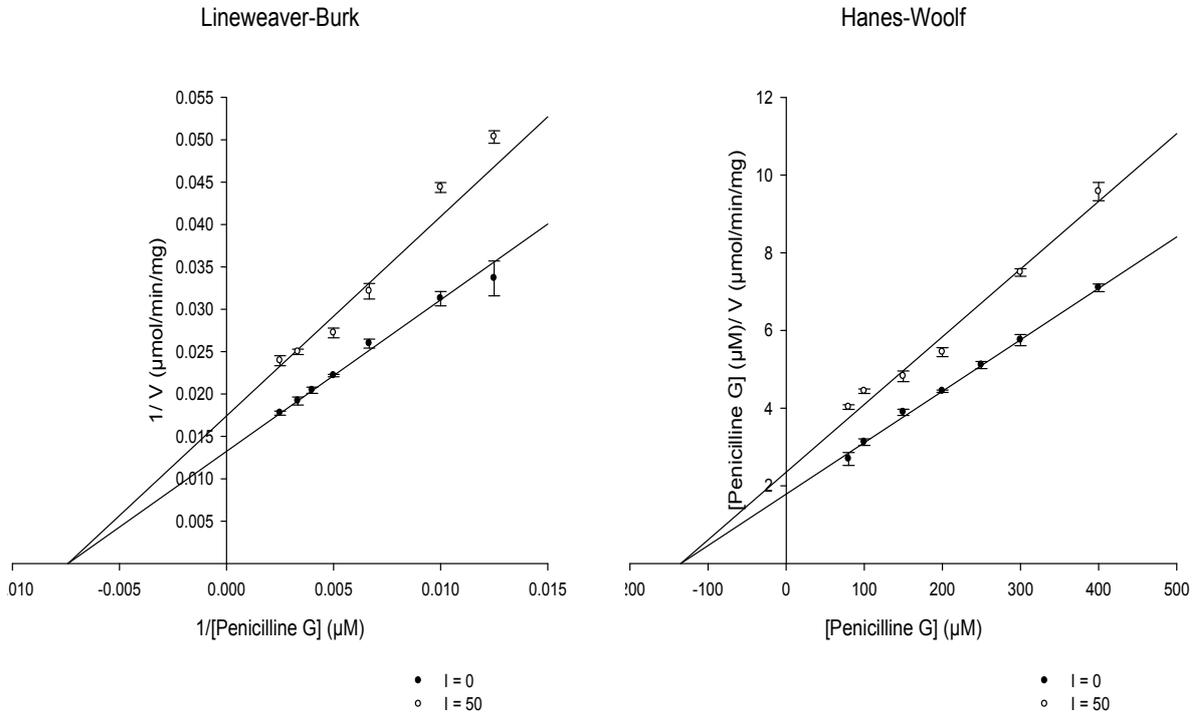


Cinétique de pénicilline G en absence et en présence du Tazobactam (1), l'acide clavulanique (2) et (3) sulbactam.

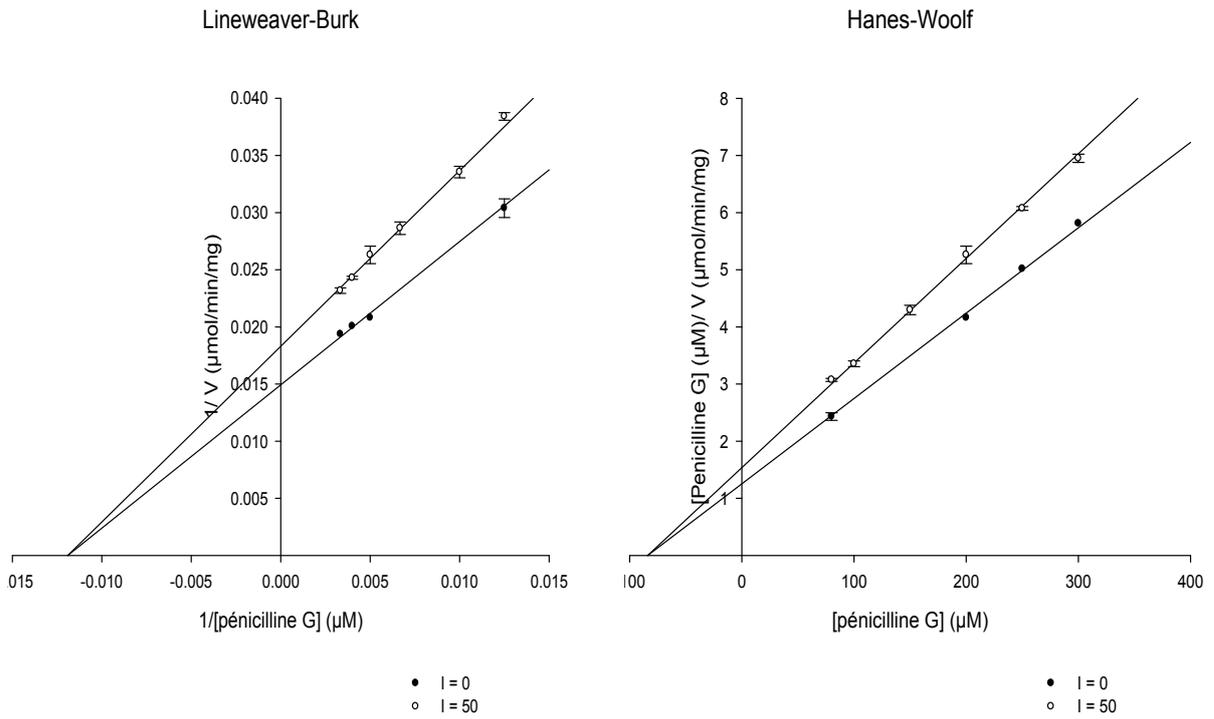
Annexe 6



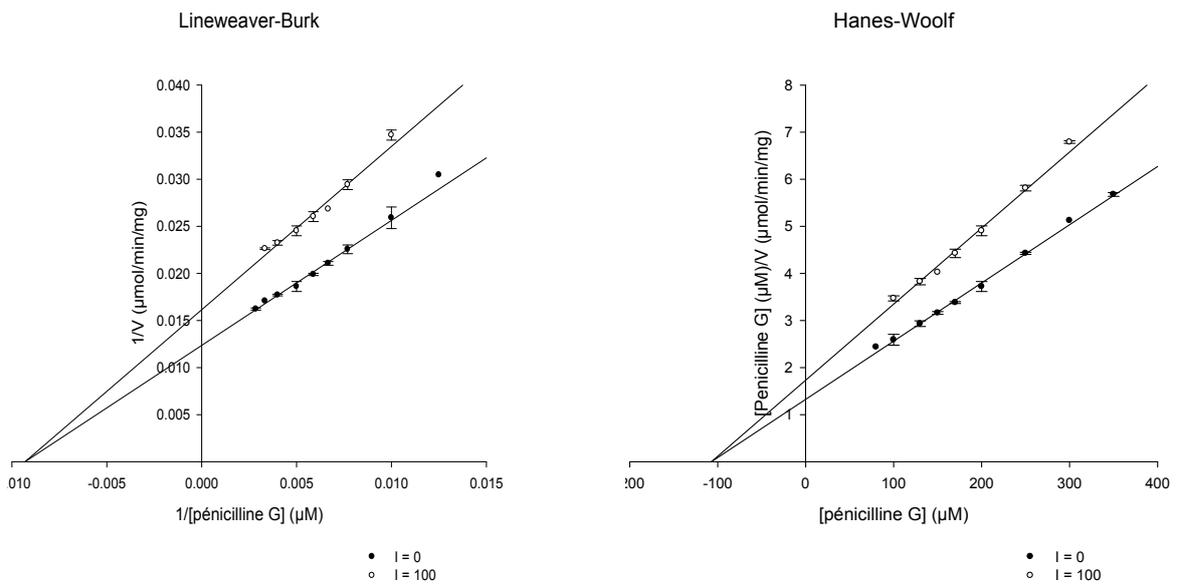
Représentation de Lineweaver-Burk et Hanes-wolf en présence et en absence de quercitrine



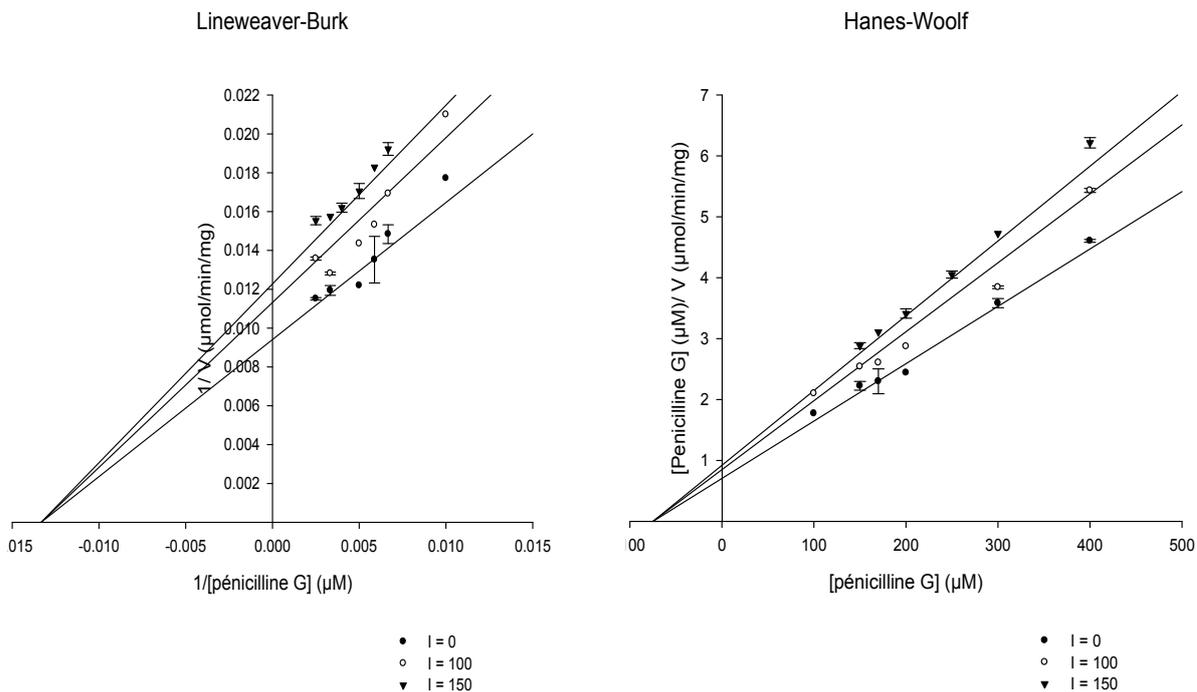
Représentation de Lineweaver-Burk et Hanes-wolf en présence et en absence de la myricétine.



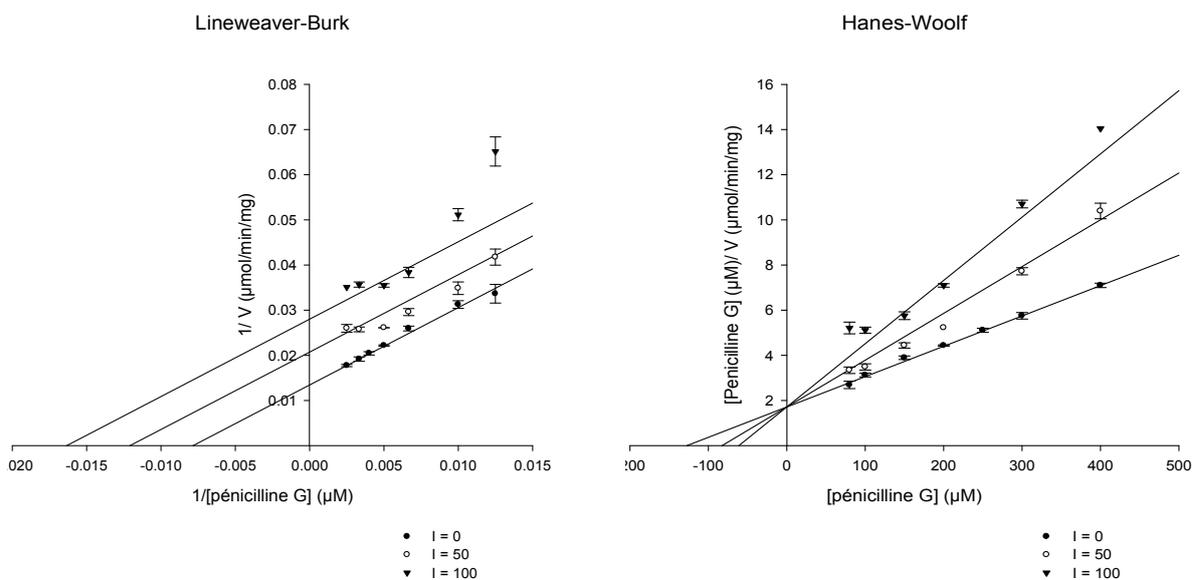
Représentation de Lineweaver-Burk et Hanes-wolf en présence et en absence du kaempférol.



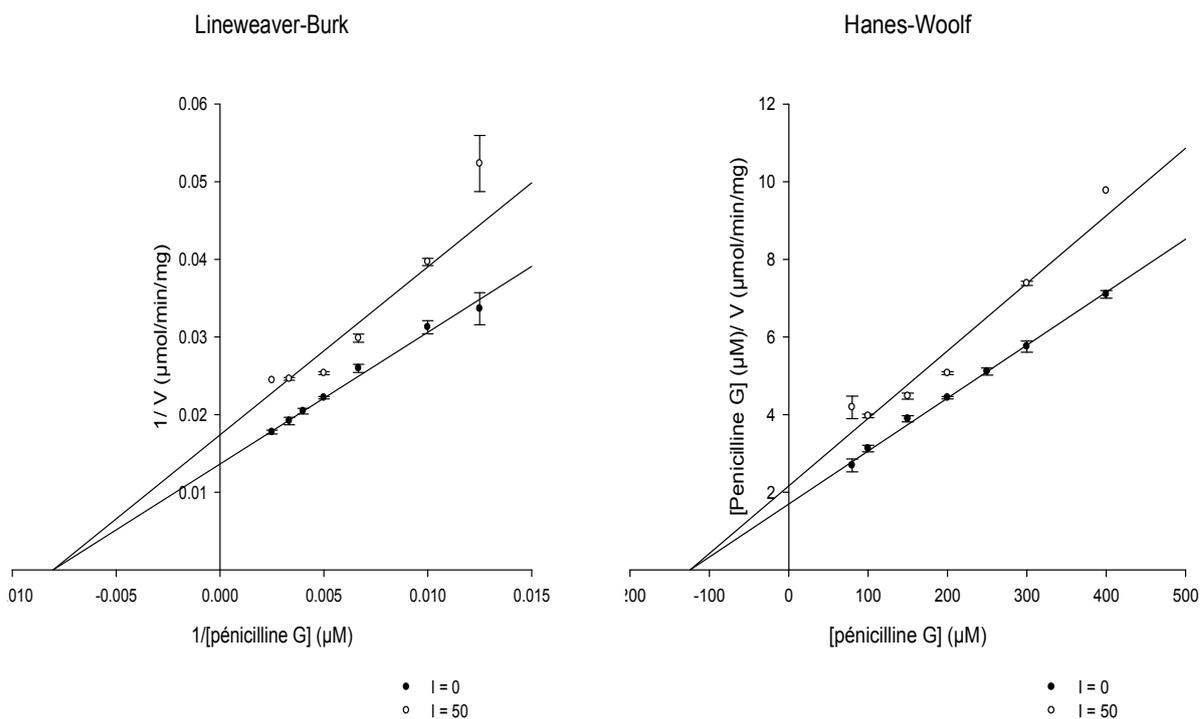
Représentation de Lineweaver-Burk et Hanes-wolf en présence et en absence de la morine.



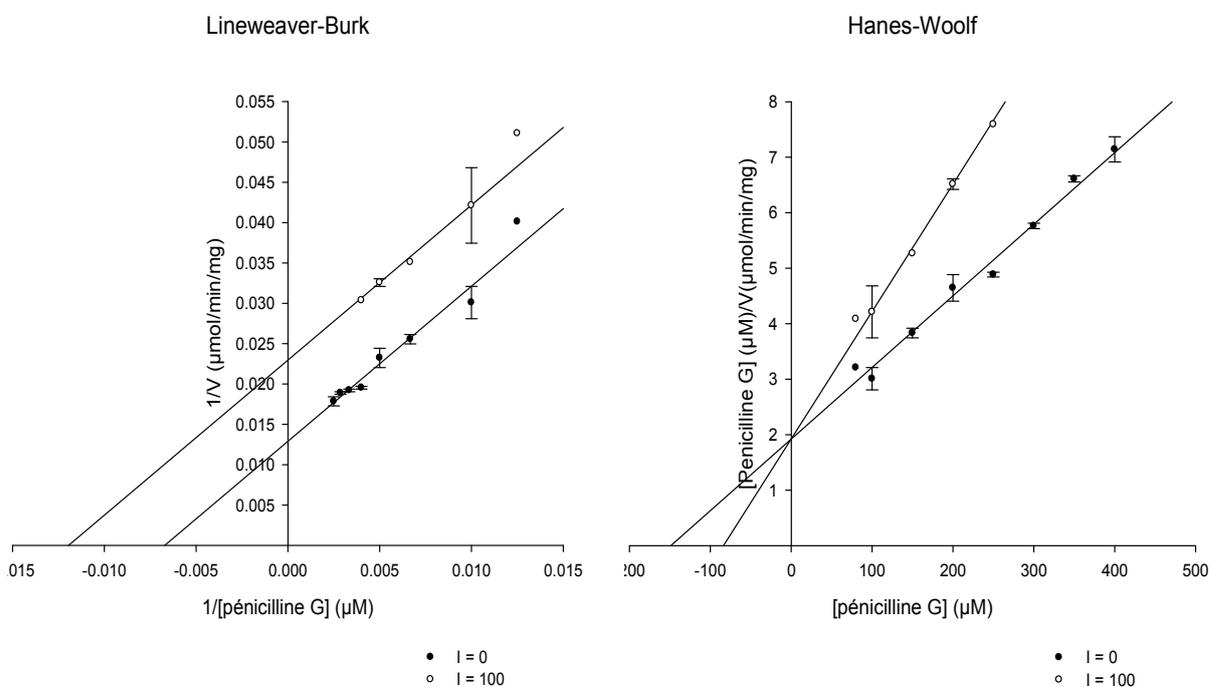
Représentation de Lineweaver-Burk et Hanes-wolf en présence et en absence de la naringénine



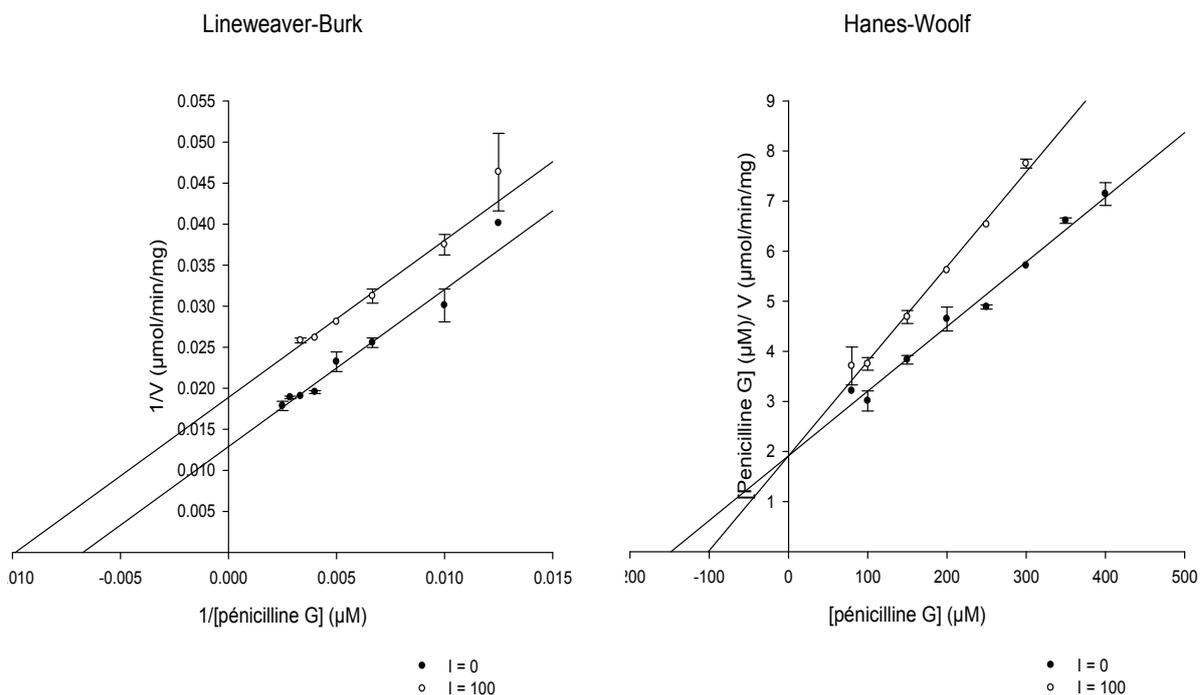
Représentation de Lineweaver-Burk et Hanes-wolf en présence et en absence de la gossypine



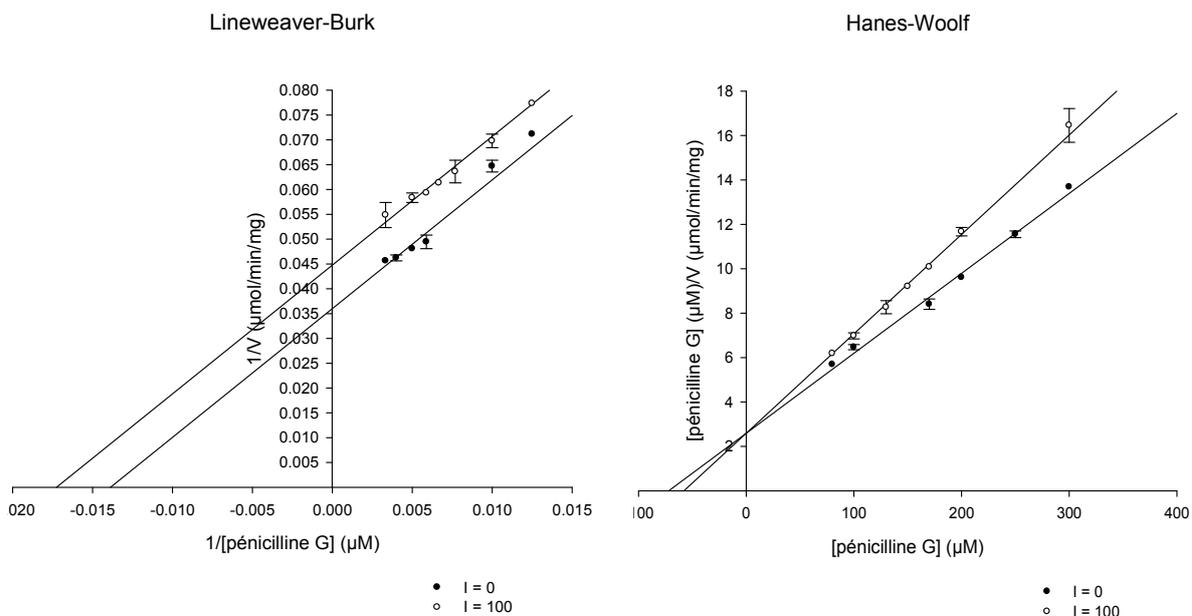
Représentation de Lineweaver-Burk et Hanes-wolf sen présence et en absence de la rutine.



Représentation de Lineweaver-Burk et Hanes-wolf en présence et en absence de la catéchine.



Représentation de Lineweaver-Burk et Hanes-wolf en présence et en absence de la quercétine.



Représentation de Lineweaver-Burk et Hanes-wolf en présence et en absence de la flavone.

