

### I.5.2. Céphalosporines

#### ► Les céphalosporines orales

Ces antibiotiques, ont une action analogue à celle d'une pénicilline A associée à l'acide clavulanique et représentent donc une alternative. Elles sont utilisées dans le traitement des infections ORL et des voies respiratoires hautes chez l'adulte sain en ville, en sachant qu'elles ont une activité médiocre sur les pneumocoques de sensibilité diminuée aux  $\beta$ -lactamines (30 à 40 % des souches). Les C1G et C2G orales sont utilisées pour les infections ORL telles que les otites ou sinusites à *Haemophilus*, et pulmonaires communautaires à Gram<sup>+</sup>, *Haemophilus* ou *Klebsiella*, les infections urinaires compliquées à entérobactéries, les infections ostéo-articulaires... Les C3G orales sont indiquées dans les pathologies ORL et les infections urinaires chez la femme enceinte (Faure, 2008).

#### ► Les céphalosporines injectables

Les C1G et les C2G injectables sont utilisées en antibioprofylaxie chirurgicale (C1G en 1<sup>ère</sup> et C2G en 2<sup>ème</sup> intention), vasculaire et osseuse mais aussi cervico-faciale, digestive, urinaire ou gynécologique du fait de leur bonne activité sur les staphylocoques (sauf méti-R) et les entérobactéries qui ne produisent pas de céphalosporinase. Les C3G parentérales sont utilisées dans les infections hospitalières sévères, y compris les méningites du fait de leur bonne diffusibilité à travers la barrière hémato-encéphalique ou chez les sujets à risque en milieu hospitalier. La ceftazidime doit être réservée aux infections à *Pseudomonas aeruginosa*. Les C4G pourraient remplacer les C3G pour le traitement des infections nosocomiales à germes résistants. En effet, elles sont actives sur les souches résistantes aux C3G (Faure, 2008).

***Chapitre II***  
***Aspect biochimique***  
***et génétique des***  
 ***$\beta$ -lactamases***

### II.1. Définition

Les  $\beta$ -lactamases, produites par les bactéries, sont des enzymes qui causent la résistance aux antibiotiques de  $\beta$ -lactamines en hydrolysant leurs cycles  $\beta$ -lactames (Hata *et al.*, 2006). Les  $\beta$ -lactamases constituent toujours le principal mécanisme de résistance naturelle et acquise aux  $\beta$ -lactamines tels que les pénicillines et les céphalosporines, en particulier chez les bactéries Gram<sup>-</sup>. Les  $\beta$ -lactamases ont été identifiées pour la première fois chez *Staphylococcus aureus* (Majiduddin *et al.*, 2002 ; Philippon and Arlet, 2006).

### II.2. Nomenclature

Les noms des  $\beta$ -lactamases dérivent des substrats préférés (ex : CTX; Céfotaximase), des propriétés biochimiques (ex : SHV; Sulfhydryl reagent variable), des particularités de séquence (ex : RTG ; Arginine, thréonine, glycine), de l'endroit de sa découverte (ex : YOU; Youville Hospital), de la position du gène sur le chromosome (*Ybx*), de la souche bactérienne (ex : AER; *Aeromonas*), du patient donneur d'échantillon (ex : TEM; *Temoneira*) et selon les auteurs (ex : PIT; Pitton). Cependant, certains enzymes sont désignés par le groupe auquel ils n'appartiennent pas (Nmc, qui signifie carbapénémase non métallo-enzyme) et d'autres possèdent plus d'un nom (OXA-23 ou ARI-1, CAZ-1 ou TEM-5) (Heritage *et al.*, 1999 ; Jacoby, 2006).

### II.3. Classification et structure

Parmi les nombreuses classifications proposées, les plus utilisées sont la classification structurale d'après Ambler et la classification fonctionnelle par groupe en fonction des spectres de substrats et d'inhibition d'après Bush-Jacoby-Meideros (tableau II) (Lavigne *et al.*, 2002).

**Tableau II** : Classes moléculaires correspondant aux groupes fonctionnels (Bush and Jacoby, 2010).

| Enzyme(s) représentatives                           | Classification Fonctionnelle (Bush) | Classification Moléculaire (Ambler) | Substrats préférés                            | Inhibiteurs |      |
|-----------------------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------------------|-------------|------|
|                                                     |                                     |                                     |                                               | CA ou TZB   | EDTA |
| <i>E.coli</i> AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1 | 1                                   | C                                   | Céphalosporines                               | Non         | Non  |
| GC1, CMY-37                                         | 1 e                                 | C                                   | Céphalosporines                               | Non         | Non  |
| PC1                                                 | 2a                                  | A                                   | Pénicillines                                  | Oui         | Non  |
| TEM-1, TEM-2, SHV-1                                 | 2b                                  | A                                   | Pénicillines, Céphalosporines                 | Oui         | Non  |
| TEM-3, SHV-2, CTX-M-15                              | 2be                                 | A                                   | Céphalosporines à large spectre, Monobactames | Oui         | Non  |
| PER-1, VEB-1                                        | 2br                                 | A                                   | Pénicillines                                  | Non         | Non  |
| TEM-30, SHV-10                                      | 2ber                                | A                                   | Céphalosporines à large spectre               | Non         | Non  |
| TEM-50                                              | 2c                                  | A                                   | Carbacillines                                 | Oui         | Non  |
| PSE-1, CARB-3                                       | 2ce                                 | A                                   | Carbécillines, céfépime                       | Oui         | Non  |
| RTG-4                                               | 2d                                  | D                                   | Cloxacillines                                 | Variable    | Non  |
| OXA-1, OXA-10                                       | 2de                                 | D                                   | Céphalosporines à large spectre               | Variable    | Non  |
| OXA-11, OXA-15                                      | 2df                                 | D                                   | Carbapénèmes                                  | Variable    | Non  |
| OXA-23, OXA-48                                      | 2 e                                 | A                                   | Céphalosporines à large spectre               | Oui         | Non  |
| Cep A                                               | 2f                                  | A                                   | Carbapénèmes                                  | Variable    | Non  |
| KPC-2, IMI-1, SME-1                                 | 3a                                  | B(B1)                               | Carbapénèmes                                  | Non         | Oui  |
| IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1,                          |                                     | B(B3)                               |                                               |             |      |
| L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1                             | 3b                                  | B(B2)                               | Carbapénèmes                                  | Non         | Oui  |
| CphA, Sfh-1                                         | Non inclus                          | 4                                   | Inconnus                                      |             |      |

### II.3.1. Classification moléculaire des $\beta$ -lactamases

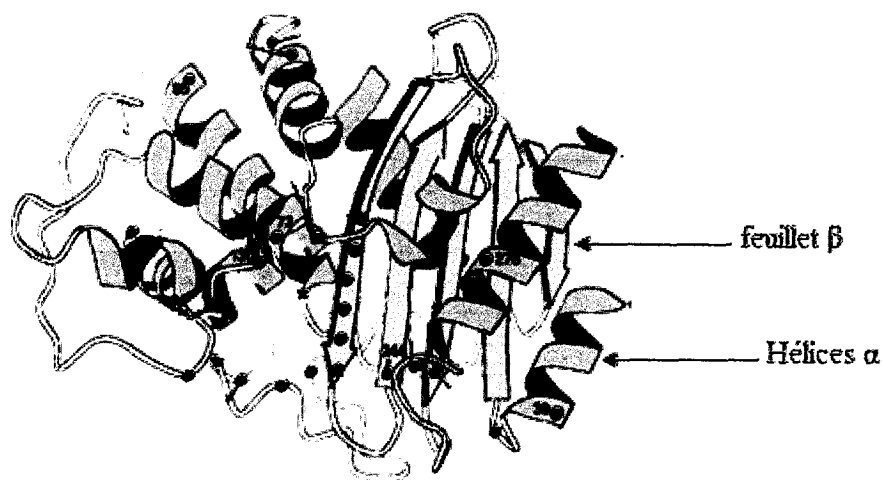
La classification d'Amblar divise les  $\beta$ -lactamases en quatre groupes (de A à D). Les groupes A, C et D contiennent des  $\beta$ -lactamases avec la sérine dans son site actif. Le groupe B contient des enzymes comportant deux atomes de zinc au site actif. Elles sont désignées comme métallo- $\beta$ -lactamases et peuvent hydrolyser les carbapénèmes (Walther-Rasmussen and Hoiby, 2006). En général, les bactéries Gram<sup>+</sup> produisent seulement des enzymes de classes A et B, tandis que les Gram<sup>-</sup> produisent des enzymes différentes provenant des quatre classes (Frère, 1995).

#### II.3.1.1. $\beta$ -lactamase à serine

Les  $\beta$ -lactamases à serine utilisent la serine du site actif pour hydrolyser le cycle  $\beta$ -lactame qui est commun aux antibiotiques de  $\beta$ -lactamines. Ces  $\beta$ -lactamases ont été divisées en trois classes, A, C, et D, en se basant sur l'homologie structurale des chaînes peptidiques (Hall and Barlow, 2004).

##### a) $\beta$ -lactamases de classe A

La structure en cristal de plusieurs  $\beta$ -lactamases de classe A des Gram<sup>+</sup> et des Gram<sup>-</sup> ont été résolues vers la fin des années 1980 et du début des années 1990. La structure des  $\beta$ -lactamases de type TEM-1 a deux domaines : domaine  $\alpha/\beta$  composé de cinq feuillets  $\beta$  et trois hélice  $\alpha$  et un domaine  $\alpha$  se composant de huit hélices  $\alpha$ , ces deux domaines constituent le noyau du site actif (figure 19). Les  $\beta$ -lactamases de classe A présentent une grande homologie aux structures de PLP. Certaines similitudes peuvent être trouvées en position tridimensionnelle de plusieurs résidus fortement conservés, y compris Ser70, Lys73, Lys234, et Ser130. Tandis que d'autres résidus sont variables. Certains de ces résidus peuvent être remplacés par des résidus ayant le même groupement fonctionnel, capable d'effectuer les mêmes fonctions (par exemple, Ser 130 est typiquement remplacée par la tyrosine dans les  $\beta$ -lactamases de la classe C, et Lys 234 est remplacé par une histidine ce qui ressemble à la structure de la R61 D, D-peptidase/transpeptidase des *Streptomyces* (Fisher *et al.*, 2005).



**Figure 19** : Structure des  $\beta$ -lactamases de classe A (Gniadkowski, 2008).

Les enzymes qui appartiennent à cette classe sont les plus rencontrées chez les bactéries pathogènes. Elles sont mieux étudiées de point de vue chimique, biochimique de biologie moléculaire (Wax *et al.*, 2008). La classe A est représentée principalement par les pénicillinases. Ces dernières sont abondamment produites par *S. aureus*, elles sont actives sur les pénicillines mais à un degré moindre sur les céphalosporines de première génération. La

plupart des céphalosporines de troisième génération, comme le céfotaxime, présentent peu ou pas d'interaction avec ces  $\beta$ -lactamases. Il en est de même pour les céfamycines et les carbapénèmes (Briskier, 1999).

Ces enzymes sont les plus figurées dans le domaine clinique, elles appartiennent essentiellement aux TEM et aux SHV. Les  $\beta$ -lactamases de cette classe ont une activité qui est totalement ou partiellement inhibée par l'acide clavulanique et le tazobactam (Coleman, 2006 ; Nordmann and Carrer, 2010).

- **$\beta$ -lactamases de type TEM**

Les  $\beta$ -lactamases de type TEM (*Temoneira Patient's Name*), d'origine plasmidique, font partie des gènes de résistance les plus disséminés et ce à travers un grand nombre de groupes d'incompatibilités plasmidiques et d'espèces bactériennes (Livermore, 1995).

Les enzymes les plus fréquemment rencontrés sont nommées TEM-1 et TEM-2. L'enzyme TEM-1 diffère de l'enzyme TEM-2 par un seul acide aminé : une glutamine pour TEM-1 et lysine pour TEM-2 en position 14 de la protéine mature (Briskier, 1999). Les  $\beta$ -lactamases de type TEM ont la capacité d'évoluer considérablement leur activité vers les céphalosporines et les monobactames. Certaines de ces enzymes sont résistantes aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases de la classe A (Hall and Barlow, 2004).

- **$\beta$ -lactamases de type SHV**

L'enzyme PIT-2, ou SHV-1, est la plus connue et la plus fréquente chez *Klebsiella*. La biogénèse de cette enzyme peut être plasmidique ou chromosomique ce qui est relativement rare. *K. pneumoniae* produit une pénicillinase chromosomique de ce type avec un bas niveau. Il en résulte que ces souches ont un bas niveau de résistance aux pénicillines usuelles (Briskier, 1999). Les SHV sont plus résistantes au sulbactam que TEM, mais plus susceptibles à l'inactivation par l'acide clavulanique. Certaines céphalosporinases chromosomiques peuvent être partiellement inhibées par le tazobactam (Bonomo and Rice, 1999).

**b)  $\beta$ -lactamases de Classe C**

Les céphalosporinases sont les enzymes de cette classe. Elles sont chromosomiques ; produites systématiquement par certaines espèces bactériennes comme *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Pseudomonas aeruginosa* (Zeba, 2005 ; Babic *et al.*, 2006). Ces  $\beta$ -lactamases sont essentiellement induisibles et sont fortement actives sur les céphalosporines de première et deuxième génération telle que la céfalotine, la céfaloridine et la céfalexine (Zeba, 2005).

Les structures tridimensionnelles de diverses  $\beta$ -lactamases de la classe C ont été obtenues par la cristallographie à rayon X. Ces structures, ont une relation étroite avec plusieurs autres structures de la classe A. Les enzymes de la classe C possèdent un domaine tout- $\alpha$  et un  $\alpha/\beta$ , avec le résidu catalytique de sérine Ser64 (Ser70 dans classe A), situant dans une distorsion entre les deux domaines. Pour les  $\beta$ -lactamases de cette classe, le premier élément est Ser64- X-X-K, contient la sérine active, le deuxième élément est Y150-A-N, et le troisième élément est K314-T-G. Un autre arrangement structural important présent dans la classe A et C des  $\beta$ -lactamases est la boucle Omega. Pour les enzymes de la classe C, la boucle Omega (résidus 185-225) est située dans une position différente que la boucle des enzymes de la classe A (Majiduddin *et al.*, 2002).

- **$\beta$ -lactamases de type AmpC**

Les  $\beta$ -lactamases de type AmpC sont des enzymes dérivées de la classe chromosomique C. Elles sont capables d'hydrolyser les céphalosporines de 2<sup>ème</sup> génération y compris les céphamycines (céfoxitine) et les céphalosporines de troisième génération ainsi que les pénicillines, mais pas le céfépime et les carbapénèmes (Muller, 2004 ; Rodriguez-villabos and Struelens, 2006).

- c)  **$\beta$ -lactamases de classe D**

La première caractéristique des  $\beta$ -lactamases de classe D est l'hydrolyse des isoxazolympenicillines (oxacillines) beaucoup plus rapidement que les pénicillines classiques (benzylpénicilline), dû le nom des oxacillinases. Ces enzymes, le plus souvent plasmidiques, ont été classiquement décrits chez *P. aeruginosa* et les entérobactéries (Walther-Rasmussen and Hoiby, 2006).

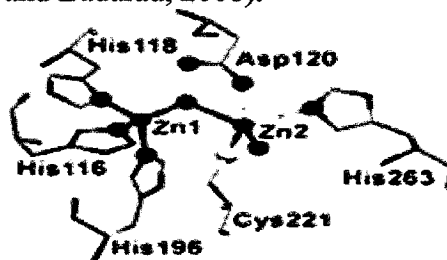
Les enzymes de classe D sont essentiellement de type OXA, ces enzymes ont au moins trente variantes, dont certaines sont des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi. Ces enzymes sont, généralement, caractérisés chez les *Pseudomonas aeruginosa*, mais ont été isolés dans plusieurs autres espèces à Gram négatif et sont de plus en plus importants pour les espèces d'*Acinetobacter*, où ils assurent une résistance aux carbapénèmes (Zeba, 2005 ; Coleman, 2006).

### II.3.1.2. Métallo- $\beta$ -lactamases

Les métallo- $\beta$ -lactamases contiennent un ou deux ions Zn dans leurs sites actifs et sont classées en trois groupes selon la nature des acides aminés liés à ces ions (tableau III) (Tamilselvi and Mugesh, 2008). En dépit de la basse similitude de la structure primaire entre les diverses métallo- $\beta$ -lactamases, la structure générale tertiaire de ces enzymes est très semblable. Ces enzymes montrent une structure sous forme « sandwich » de  $\alpha\beta/\beta\alpha$  composée de deux feuillets  $\beta$  au noyau et cinq hélices  $\alpha$  sur les surfaces. Deux accepteurs de zinc sont présents dans les métallo-enzymes, généralement un ion de zinc (Zn1) est combiné aux résidus His116, His118 et His196, et l'autre zinc (Zn2) est combiné aux résidus Asp120, Cys221 et His 263 (Majiduddin *et al.*, 2002).

- **Groupe B1**

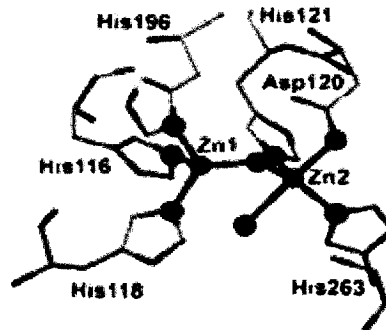
Le groupe B1 est le plus grand et le plus étudié, il inclut la BcII de *Bacillus cereus*, CcrA des *Bacteroides fragilis*, l'IMP-1 de *Pseudomonas aeruginosa*, la BlaB de *Chrysebacterium meningosepticum*, et l'IND-1 de *C. indologens*. Cette sous-classe est caractérisée par un ion Zn1, composé de trois résidus de His, et le Zn2 composé d'un His, un Cys et un Asp, la structure de métallo- $\beta$ -lactamases de groupe B1 est représentée dans la figure 20 (Heinz and Adolph, 2004 ; Tamilselvi and Mugesh, 2008). Ces enzymes catalysent efficacement l'hydrolyse des substrats tels que les pénicillines, les céphalosporines, et les carbapénèmes. BcII hydrolyse les pénicillines à des taux sensiblement plus élevés que les céphalosporines et les carbapénèmes, mais CcrA ne montre pas cette préférence, bien que les deux enzymes présentent des valeurs plus basses de  $k_m$  pour les céphalosporines (Page and Badarau, 2008).



**Figure 20** : Structure de métallo- $\beta$ -lactamase de groupe B1 (Tamilselvi and Mugesh , 2008).

- **Groupe B2**

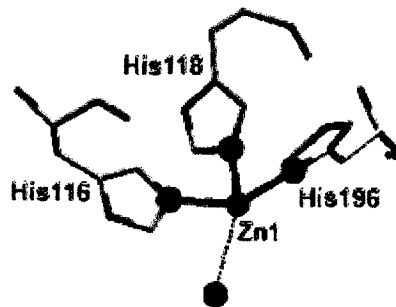
La deuxième sous-classe B2, inclut CphA d'*Aeromonas hydrophila*, ImiS de *A. veronii*, et Sfh-1 des *Serratia marcescens*. La CphA et la ImiS sont les représentantes de cette sous-classe, hydrolysent préférentiellement les carbapénèmes, par exemple, l'imipénème et le méropénème, mais ont une activité faible vis-à-vis des pénicillines et des céphalosporines. Ces enzymes sont caractérisés par un récepteur de Zn 1 identique à celui des enzymes de la sous-classe B1, et un récepteur de Zn 2 avec une des histidines remplacée par un résidu d'asparagine, la structure des deux récepteurs est représentée dans la figure 21 (Heinz and Adolph, 2004 ; Page and Badarau, 2008 ; Tamilselvi and Mugesh, 2008).



**Figure 21** : Structure de métallo- $\beta$ -lactamase de group B2 (Tamilselvi and Mugesh , 2008).

- **Groupe B3**

La sous-classe B3 inclut L1 et GOB-1, ces enzymes produites par *S. maltophilia* et *E. meningoseptica*. Et FEZ-1 de *Legionella gormanii*. La sous-classe B3 a les mêmes récepteurs dans l'accepteur 1 de zinc comme la sous-classe B1, mais le récepteur de cystéine des sous-classes B1 et B2 dans l'accepteur 2 est remplacé par une histidine, la structure de métallo- $\beta$ -lactamase de groupe B3 est représentée dans la figure 22 (Heinz and Adolph, 2004 ; Bebrone, 2007).



**Figure 22** : Structure des métallo- $\beta$ -lactamases de groupe B3 (Tamilselvi and Mugesh , 2008).

**Tableau III** : Metallo- $\beta$ -lactamases (Walsh *et al.*, 2005).

| Sous classe | Organisme                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Nom de l'enzyme                                                                                                                      |
|-------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| B1          | <i>Bacillus cereus</i><br><i>Bacillus anthracis</i><br><i>Alkalophilic Bacillus Spp</i><br><i>Chryseobacterium indologenes</i><br><i>Chryseobacterium meningosepticum</i><br><i>Chryseobacterium gleum</i><br><i>Myroides odoratus</i><br><i>Flavobacterium johnsoniae</i><br><i>Aeromonas hydrophilia</i> | BcII-5/B/6, BcII-569/H<br>Bla2<br>Bce 170<br>IND-1, IND-2,2a, 3,4<br>BlaB, BlaB2, BlaB3, BlaB4-8<br>CGB-1<br>TUS-1<br>JOHN-1<br>CphA |

|    |                                                                                                                                                   |                                                         |
|----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| B2 | <i>Aeromonas veronii</i><br><i>Serratia fonticola</i><br><i>Caulobacter crescentus</i>                                                            | Imi, AsbM1<br>SFH-1<br>Mb11B, CAU-1                     |
| B3 | <i>Janthinobacterium lividium</i><br><i>Legionella gormanii</i><br><i>Chryseobacterium meningosepticum</i><br><i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | TIN-B<br>FEZ-1<br>GOB1-7<br>Lla, L1-Blas, L1c, L1d, L1e |

### II.3.2. Classification fonctionnelle des $\beta$ -lactamases

La classification fonctionnelle ou la classification de Bush-Jacoby-Medeiros est fondée sur les caractéristiques physicochimiques des enzymes comme leur point isoélectrique, poids moléculaire, profil de substrat et profil d'inhibition (Rodriguez-Villalobos and Struelens, 2006).

La classification fonctionnelle divise les  $\beta$ -lactamases en quatre groupes :

#### II.3.2.1. Groupe 1

Le groupe 1 sont des céphalosporinases non inhibées par l'acide clavulanique, elles appartiennent à la classe moléculaire C (Samaha-Kfoury and Araj, 2003). Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce. Parfois présentes mais non exprimées (comme chez *E. coli*), elles peuvent s'exprimer à bas ou à haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes. Le phénotype « céphalosporinase bas niveau » est, dans la majorité des cas, réprimé chez cette bactérie. Il confère une résistance aux aminopénicillines, aux C1G et pour certaines souches aux C2G. Ces enzymes sont inhibées par la cloxacilline mais sont insensibles aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases. Certaines céphalosporinases plus rares sont d'origine plasmidique (Lavigne *et al.*, 2002).

#### II.3.2.2. Groupe 2

Ce groupe est divisé en sous-groupes en fonction du substrat préférentiel de la  $\beta$ -lactamase : pénicillines, céphalosporines, oxyimino- $\beta$ -lactamines, cloxacilline, carbénicilline ou carbapénème. Les deux sous classes ont été décrites sont celles des mutants TEM avec une sensibilité diminuée à l'acide clavulanique (2br) et les carbapénémases chromosomiques de classe A (2f) d'*Enterobacter* et de *Serratia* (Cavallo *et al.*, 2004).

Le sous-groupe 2be, avec la lettre "e" pour élargir le spectre d'activité, représente les BLSE, qui sont capables d'inactiver les céphalosporines de troisième génération (ceftazidime, céfotaxime, et cefpodoxime) aussi bien que les monobactames (aztréonam).

Plus tard, le sous-groupe 2c a été isolé du groupe 2 parce que ces enzymes inactivent la carbénicilline plus que la benzylpénicilline, avec un certain effet sur la cloxacilline.

Les enzymes de sous-groupe 2d inactivent la cloxacilline plus que la benzylpénicilline, avec une certaine activité sur la carbénicilline. Ces enzymes sont non inhibés par l'acide clavulanique, certaines enzymes de ce groupe sont des BLSE.

Les enzymes de sous-groupe 2e sont des céphalosporinases peuvent hydrolyser les monobactames, et ils sont inhibés par l'acide clavulanique. Le sous-groupe 2f a été ajouté parce



que sont des carbapénèmases à sérine, contrairement aux carbapénèmases appartenant au groupe 3 (métallo- $\beta$ -lactamases) (Samaha-Kfoury and Araj, 2003).

### II.3.2.3. Groupe 3

Les  $\beta$ -lactamases de groupe 3 incluent les métallo- $\beta$ -lactamases inhibées par l'EDTA. Les enzymes décrits de ce groupe sont non inhibés par l'acide clavulanique, et aucune d'entre eux semble contenir un résidu sérine du site actif. Leur importance clinique est accentuée par le fait qu'ils hydrolysent les carbapénèmes. Ce sont, généralement, des métallo- $\beta$ -lactamases à large spectre qui hydrolysent une variété de pénicillines et de céphalosporines. Ce groupe correspond à la classe moléculaire B (Galleni *et al.*, 2001).

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

### II.3.2.4. Groupe 4

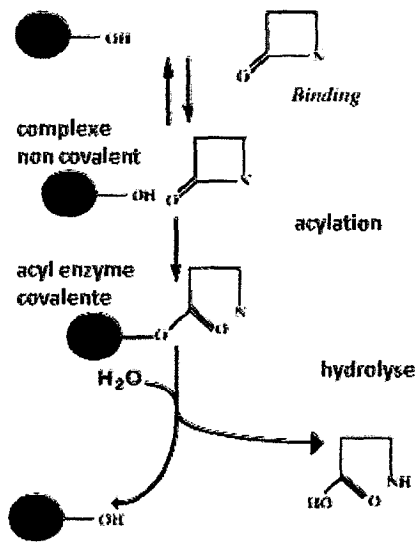
Ce dernier groupe réunit moins d'une dizaine d'enzymes, relativement, rarement rencontrées. Ces dernières sont insensibles à l'acide clavulanique et s'insèrent mal dans d'autres groupes ou classes moléculaires. Il s'agit en général d'enzymes à support chromosomique avec des profils hydrolytiques de pénicillinases et rencontrés dans des espèces aussi diverses que *E. coli*, *B. fragilis*, *Campylobacter jejuni*, *B. cepacia*, *Alcaligenes faecalis*, *Pseudomonas paucimobilis* ou *Clostridium butyricum* (Cavallo *et al.*, 2004).

## II.4. Mécanisme d'action de $\beta$ -lactamases

La fragilité chimique des  $\beta$ -lactamines se situe en grande partie au niveau du cycle  $\beta$ -lactame dont l'hydrolyse par des  $\beta$ -lactamases est irréversible et génère un ou plusieurs produits inactifs. Les  $\beta$ -lactamases ont une structure proche des enzymes impliqués dans la synthèse du peptidoglycane de la bactérie. Le mode d'action des  $\beta$ -lactamines sur une bactérie sensible consiste à entraîner une erreur des peptidases aboutissant à un défaut de synthèse du peptidoglycane ce qui provoque la mort bactérienne, la bactérie synthétise une  $\beta$ -lactamase qui va hydrolyser le cycle  $\beta$ -lactame. Son ouverture va empêcher sa reconnaissance par la peptidase et donc la synthèse du peptidoglycane est possible (Lavigne *et al.*, 2002).

La réaction peut procéder par au moins deux mécanismes séparés, dépendant des caractéristiques du site actif de différents enzymes et des PLPs ; qui réagissent avec des  $\beta$ -lactames par l'intermédiaire d'une sérine du site actif. Cependant, des  $\beta$ -lactamases appartenant à la famille des métallo-enzymes peuvent utiliser des ions métalliques (de zinc) pour l'hydrolyse (Muller, 2004 ; Bush, 2009).

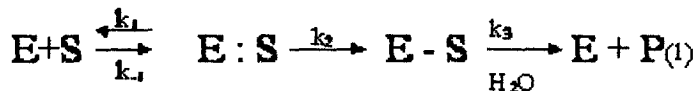
Les PLPs et les  $\beta$ -lactamases à sérine hydrolysent les  $\beta$ -lactames en formant un complexe d'acyl-enzyme par l'intermédiaire du résidu sérine du site actif (figure 23). Dans cette réaction, l'acylation et la désacylation se produisent à différents taux. Pour les  $\beta$ -lactamases, l'acylation et la désacylation sont généralement plus rapides que celles des PLPs. Le taux d'hydrolyse est déterminé par l'activité enzymatique sur l'antibiotique spécifique ( $k_m$  et  $V_{max}$ ) et la concentration en enzyme (Muller, 2004 ; Bush, 2009).



**Figure 23 :** Mécanisme d'hydrolyse du cycle  $\beta$ -lactame par les  $\beta$ -lactamases à sérine (Livermore, 1995).

**II.5. Enzymologie des  $\beta$ -lactamases**

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



P est le produit acide inactif,  $K_1$ ,  $k_{-1}$ ,  $k_2$  et  $k_3$  représentent des constantes catalytiques dont  $k_2$  est la constante de taux d'acylation et  $k_3$  est la constante de taux de désacylation (Bonomo and Rice, 1999).

La liaison amide du noyau  $\beta$ -lactame subit une attaque nucléophile par l'hydroxyle de la sérine de l'enzyme. La capacité des  $\beta$ -lactamines d'être efficacement hydrolysé par la  $\beta$ -lactamase dépend de la composition et la structure des groupes R. Certains groupes R empêchent ou gênent l'entrée facile des  $\beta$ -lactamines dans le site actif. Bien qu'il y ait une large acceptation du schéma réactionnel général, les détails moléculaires remettent encore en question notre compréhension (Bonomo and Rice, 1999).

Il est généralement admis que la formation de l'enzyme acyle souvent, relativement, instable (EA) est irréversible, c'est à dire  $k_{-2} = 0$  et la vitesse de la constante de second ordre  $k_{cat} / K_m$ , déterminée en conditions de saturation, est alors donnée par l'équation (2) et reflète donc toujours la vitesse de désacylation qui ne tient pas compte de la valeur de  $k_2$  et  $k_3$ .

$$\frac{\text{Taux}}{(E) (S)} = \frac{k_{cat}}{K_m} = \frac{k_1 k_3}{k_{-1} + k_2} \quad (2)$$

Dans des conditions de saturation, la constante de vitesse observée  $k_{cat}$  est indépendante de la concentration du substrat et est donnée par l'équation et simplifie ainsi la vitesse d'acylation  $k_2$ , si  $k_3 \gg k_2$  et l'enzyme est essentiellement présent sous forme du complexe enzyme-substrat.

Inversement,  $k_{cat}$  reflète la vitesse de désacylation,  $k_3$ , lorsque  $k_2 \gg k_3$ , et l'enzyme est présent, principalement, comme acyl-enzyme.

$$k_{cat} = \frac{k_2 k_3}{k_2 + k_3} \quad (3)$$

Toutefois, si la formation de l'acyl-enzyme est réversible,  $k_{cat} / k_m$  et  $k_{cat}$  sont donnés par les équations (4) et (5) respectivement (Page and Laws, 1998).

$$\frac{k_{cat}}{K_m} = \frac{k_1 k_2 k_3}{k_3 (k_{-1} + k_2) + k_{-1} k_{-2}} \quad (4)$$

$$k_{cat} = \frac{k_2 k_3}{k_2 + k_{-2} + k_3} \quad (5)$$

## II.6. $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BLSE)

### II.6.1. Définition des BLSE

Les BLSE sont définies comme des enzymes appartenant à la classe A ou D de la classification d'Ambler, capables d'hydrolyser les pénicillines, céphalosporines de première, deuxième, troisième et quatrième générations (C1G, C2G, C3G et C4G) et l'aztréonam (Rodriguez-Villalobos and Struelens, 2006).

Ce terme désigne les  $\beta$ -lactamases responsables de la résistance aux  $\beta$ -lactamines à large spectre, habituellement actives contre les bacilles Gram<sup>-</sup>. Ces enzymes dérivent, par mutation, de pénicillinases (TEM, SHV) d'origine plasmidique. Elles sont produites, généralement, par de nombreuses Entérobactéries comme *Klebsiella*, *Salmonella*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Proteus* et plus rarement par *E. coli* (moins de 0,1% en France). La plupart de ces isolats cliniques produisant des BLSE de type TEM ou SHV ont été retrouvés au cours d'épidémies nosocomiales (Lavigne *et al.*, 2002). Dans la classification de Bush, les BLSE sont regroupées dans deux sous-groupes du groupe 2, le sous-groupe 2be (BLSE de classe A) et 2d (BLSE de classe D). Elles n'hydrolysent pas les céphamycines, les carbapénèmes et sont, généralement, inhibées par les inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases (acide clavulanique, tazobactam et sulbactam) (Al-Jasser, 2006 ; Poirel *et al.*, 2012).

### II.6.2. Différents types de BLSE

La plupart des BLSE sont des dérivés des enzymes de TEM ou de SHV il y a plus de 90  $\beta$ -lactamases de type TEM et plus de 25 SHV dont leur structure est déterminée, pour les deux groupes d'enzymes, quelques mutations dans leur gène provoquent l'augmentation de leur spectre d'activité (Bradford, 2001). Toutefois, toutes ces BLSE ont la particularité d'être inhibées par l'acide clavulanique. Cette propriété est utilisée en routine pour la réalisation de test de synergie entre un disque de ceftazidime (ou de céfépime) et un disque contenant de l'acide clavulanique, habituellement en association avec de l'amoxicilline (Mérens *et al.*, 2011).

#### II.6.2.1. Type TEM

La majorité des BLSE de type TEM, dérivent par quatre à sept mutations ponctuelles de l'enzyme originelle TEM-1 ou TEM-2 (plus de 140 enzymes). Ces mutations rendent l'enzyme capable d'hydrolyser les C3G, mais aussi plus sensible à l'action des inhibiteurs (acide clavulanique). Cependant, d'autres mutations peuvent conférer la résistance aux inhibiteurs. Ces

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

#### II.6.2.2. Type SHV

La BLSE de type SHV a été observée principalement chez *Enterobacter cloacae*. Le type SHV constitue celui comportant le plus grand nombre (supérieur à 70) de BLSE. Comme dans le cas des enzymes de type TEM, les enzymes de type SHV dérivent par mutations ponctuelles de l'enzyme originelle SHV-1. L'origine de ces enzymes est probablement une variante de l'enzyme chromosomique K2 de *K. pneumoniae* (Rodriguez-Villalobos and Struelens, 2006 ; Giraud-Morin and Fosse, 2008).

#### II.6.2.3. Type CTX-M

Les BLSE de type CTX-M (Cefotaximase First Isolated in Munich) ont été décrites initialement en 1986 (FEC-1) au Japon, en Allemagne et en France en 1989 (CTXM-1), puis sont disséminées largement dans le monde, en particulier les CTX-M-3 et les CTX-M-15 qui sont les principales BLSE décrites en Algérie. L'origine de ces enzymes est, probablement, par le transfert horizontal de gène et les mutations subséquentes, des  $\beta$ -lactamases chromosomiques (AmpC) de *Klyuvera ascorbata* (90% d'homologie avec la CTX-M-2) (Sturenburg and Mack, 2003 ; Rodriguez and Struelens, 2006 ; Labadene *et al.*, 2009).

Actuellement, les BLSE de type CTX-M sont les plus fréquemment isolées sans compter de très exceptionnelles épidémies d'infections nosocomiales. La dissémination de ces enzymes et en particulier du variant CTX-M-15 concerne fréquemment l'ensemble des Entérobactéries, notamment *K. pneumoniae*. Les enzymes de type CTX-M sont divisées en cinq sous-groupes phylogénétiquement différents. Elles doivent initialement leur dénomination au fait de présenter une plus forte hydrolyse du céfotaxime que les autres céphalosporines de troisième génération. Le variant CTX-M-15 appartient au sous-groupe CTX-M-1 et dérive de CTX-M-3. Sa séquence protéique présente une mutation ponctuelle en position 240 qui conduit à une plus forte hydrolyse de la céftazidime comparée à celle du céfotaxime (Carrer and Nordmann, 2011).

#### II.6.2.4. Type OXA

Les BLSE de la classe D sont également appelées «oxacillinases à spectre élargi » (ES-OXA) par opposition aux «oxacillinases à spectre étroit » et aux oxacillinases à activité carbapénèmase. Pour la plupart, ces BLSE dérivent d'oxacillinases à spectre étroit par des mutations ponctuelles. Les BLSE de type OXA dérivent de OXA-10 (OXA-11, OXA-13, OXA-14 to OXA-17, OXA-19, OXA-28 et OXA-35), OXA-2 (OXA-15 et OXA-32). Leur activité enzymatique, variable sur les uréidopénicillines, les carboxypénicillines, l'aztréonam et les C3G, est peu inhibée par l'acide clavulanique sauf en ce qui concerne OXA-18 et OXA-45 (Sturenburg and Mack, 2003 ; Mérens *et al.*, 2011).

#### II.6.2.5. Autres types de BLSE

D'autres types plus rares de BLSE, appartenant à la classe A, incluent BES, GES, VEB, SFO, TLA et PER. Elles sont inhibées par l'acide clavulanique et en général ont le même substrat que TEM et SHV. Les enzymes BES-1, SFO-1 et TLA-1 ont été retrouvées chez les entérobactéries (Rodriguez-Villalobos and Struelens, 2006).

#### \*PER

Les BLSE de type PER (*Pseudomonas* Extended Resistance) sont inhibées par l'acide clavulanique. Les enzymes PER-1 ont été détectées pour la première fois en Turquie. Plus tard, elles ont été identifiées parmi des isolats de *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* et

*Acinetobacter baumannii*, *Porteus mirabilis* et *Alcaligenes fecalis*. Bien que l'enzyme PER-1 ait été, principalement, découverte en Turquie, elle a été détectée également en France, en Italie, en Belgique et en Corée. PER-2 a été détectée chez *Salmonella enterica* serover *Typhimurium*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, et *Vibrio cholera* O1, El Tor. Per-2 a été détectée seulement en Amérique du Sud (Al-jasser, 2006 ; Rodriguez-Villalobos and Struelens, 2006).

#### \*GES

Les BLSE de type GES (Guiana Extended Spectrum  $\beta$ -lactamase) sont rapportées de plus en plus dans des germes Gram<sup>-</sup>, y compris *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* et *E. coli*. GES-1 a été au début caractérisée dans un isolat de *K. pneumoniae* en France, codée par des plasmides ou des intégrons, GES-2 était en Afrique du Sud, GES-5, GES-6, GES-7 et GES-8 étaient en Grèce, et GES-3 et GES-4 étaient au Japon GES-5 également a été rapportée récemment en Corée, en Chine et au Brésil. Ainsi, des variantes semblables aux GES sont actuellement identifiées dans de nombreux pays. Toutes les variantes de GES possèdent la capacité d'hydrolyser les céphalosporines à spectre large (Naas *et al.*, 2008 ; Nordmann *et al.*, 2012).

#### \*VEB

Les BLSE de type VEB-1 (Vietnamese Extended Spectrum  $\beta$ -lactamase) ont été identifiées d'abord chez *E. coli*, un isolat récupéré en France d'un enfant vietnamien. Contrairement aux carbapénèmes et aux céphamycines, la VEB-1 confère une résistance élevée au ceftazidime, céfotaxime et monobactames. Cette BLSE est bien inhibée par l'acide clavulanique et le tazobactam. Le gène de VEB a été décrit parmi les isolats d'entérobactéries en Europe, mais également chez *P. aeruginosa* du Thaïlande et du Koweït (Poirel *et al.*, 2012).

#### \*KPC

Les données biochimiques montrent que les enzymes de type KPC (*Klebsiella Pneumoniae* Carpanémases) sont capables d'hydrolyser toutes les  $\beta$ -lactamines : pénicillines, céphalosporines, carbapénèmes et monobactames (aztréonam). Seule l'activité des céphamycines et de la ceftazidime est peu modifiée. Parmi les céphalosporines de troisième génération, le céfotaxime est la molécule la plus hydrolysée, et pour les carbapénèmes la KPC possède l'affinité la plus élevée pour le mérépénème. Après la première description de KPC-1/2, l'incidence des souches de *K. pneumoniae* productrices de cette carbapénémase a augmenté régulièrement dans la région de New-York (Cuzon *et al.*, 2010).

### II.6.3. Epidémiologie des BLSE

Découvertes en Europe dans les années 1980, les BLSE ont aujourd'hui une répartition mondiale. Leur prévalence varie d'un pays à un autre, d'une région à une autre, d'une ville à une autre et même d'un hôpital à un autre. Ces variations dépendent de plusieurs facteurs parmi lesquelles la détection de ces enzymes, les mesures de surveillances des maladies infectieuses, l'utilisation abusive des antibiotiques. Les facteurs spécifiques de risque d'acquisition des BLSE chez les patients hospitalisés sont : une longue hospitalisation, la sévérité de la maladie, l'intervention chirurgicale, le séjour au service de soins intensifs, l'intubation et la ventilation et le port de cathéters artériels ou urinaires. D'abord qualifiés de résistance hospitalière, les BLSE sont de plus en plus détectées chez des patients communautaires. Des travaux ont été rapportés en Espagne, Israël, Etats unis, Angleterre, Canada et Tanzanie sur les infections communautaires causées par les BLSE (Bradford, 2001; Paterson and Bonomo, 2005).

A partir de 1995, de «nouvelles» BLSE (notamment CTX-M) ont été émergées de façon explosive chez les entérobactéries et la situation épidémiologique a complètement changée au niveau mondial. En effet, la plupart des souches productrices de BLSE sont maintenant des

souches d'*E. coli* exprimant des BLSE de type CTX-M responsables d'infections communautaires, notamment urinaires (Pitout *et al.*, 2005).

#### II.6.4. Les facteurs de risque

De nombreuses études ont analysé les facteurs de risque pour l'acquisition (colonisation ou infection) d'une souche productrice de BLSE par des patients hospitalisés, le plus souvent en soins intensifs. La majorité de ces études sont de type études cas-témoins. De nombreuses différences existent entre ces études dans les populations sélectionnées, la taille de l'échantillon et la sélection des cas et des témoins. En général, l'acquisition de bactéries productrices de BLSE concerne des patients gravement malades, suite à une hospitalisation prolongée et après exposition à des dispositifs invasifs (cathéters veineux, sonde urinaire ou tube endotrachéal). D'autres facteurs de risque sont la malnutrition, l'hémodialyse, la nutrition parentérale totale, l'admission en réanimation ou l'hospitalisation préalable. Différents facteurs en relation avec la thérapie antibiotique ont été fréquemment associés avec l'acquisition d'une souche productrice de BLSE : l'exposition préalable aux C3G, le nombre d'antibiotiques administrés et la durée du traitement. Le séjour dans les centres de soins chroniques a été aussi impliqué dans certains pays. (Rodriguez-Villalobos and Struelens, 2006).

#### II.6.5. Détection de BLSE

La démonstration phénotypique de la présence de BLSE consiste à mettre en évidence la présence d'une synergie entre une C3G ou C4G et l'acide clavulanique. La confirmation doit être réalisée avec un minimum de deux substrats (ceftazidime et céfotaxime) par les méthodes de synergie en double disque, disques combinés ou E-test. D'autres méthodes de confirmation non phénotypiques consistent en la focalisation isoélectrique (qui permet la caractérisation des enzymes par son point isoélectrique) et des méthodes moléculaires pour la détection des gènes codant pour la BLSE fondées sur la réaction en chaîne de la polymérase (PCR) ou le séquençage du gène (Rodriguez-Villalobos and Struelens, 2006).

##### II.6.5.1. Double disque (DD-test)

Le test de double disque est le premier test de détection, décrit par Jarlier et ces collaborateurs en 1988 (Shah *et al.*, 2004). Est un test pratique de dépistage des BLSE. L'isolat est ensemencé sur une boîte contenant une gélose Mueller-Hinton avec un disque imprégné d'amoxicilline/acide clavulanique au centre. Un ou plusieurs disques contenant des céphalosporines de troisième génération ou de l'aztréonam sont placés à 20-30 mm du disque central. En présence d'une BLSE, la diffusion d'acide clavulanique entraînera une zone de potentialisation entre le disque central et le disque imprégné de céphalosporine (figure 24) (Muller, 2004)

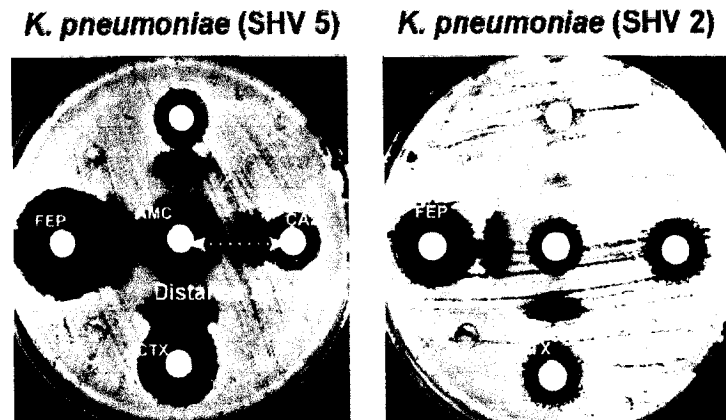


Figure 24 : Technique de double disque chez *K. pneumoniae* (Sturenburg and Mack, 2003).

### II.6.5.2. E-test

L'E-test est une méthode précise, rapide et simple à réaliser. Il combine les concepts de dilution et de diffusion (Hamdad *et al.*, 2006). Cette méthode est basée sur l'identification de la réduction de la CMI de ceftazidime en présence d'une concentration fixe de l'acide clavulanique. La bandelette d'E-test contient un gradient du ceftazidime (TZ) sur une extrémité et sur l'autre extrémité un gradient de ceftazidime combiné à l'acide clavulanique (TZL). Après l'incubation, au point d'intersection entre la zone d'inhibition (ellipse d'inhibition) et la bandelette, la concentration en antibiotique correspond à la CMI de la souche étudiée. La présence de BLSE est confirmée par l'aspect d'une zone « fantôme » ou une déformation de l'ellipse de TZ en présence de l'acide clavulanique. Des bandelettes contenant un gradient de céfotaxime/clavulanate (CT/CTL) sont aussi disponibles. Afin de détecter l'affinité des BLSE aux différents substrats, ce test doit être effectué avec les deux types de bandelettes de CT/CTL et de TZ/TZL (figure 25). Des études de comparaison avec les isolats cliniques, ont montré que l'E-test était le plus sensible que les méthodes de double disque et était le plus commode à utiliser (Sturenburg and Mack, 2003 ; Paterson and Bonomo, 2005).

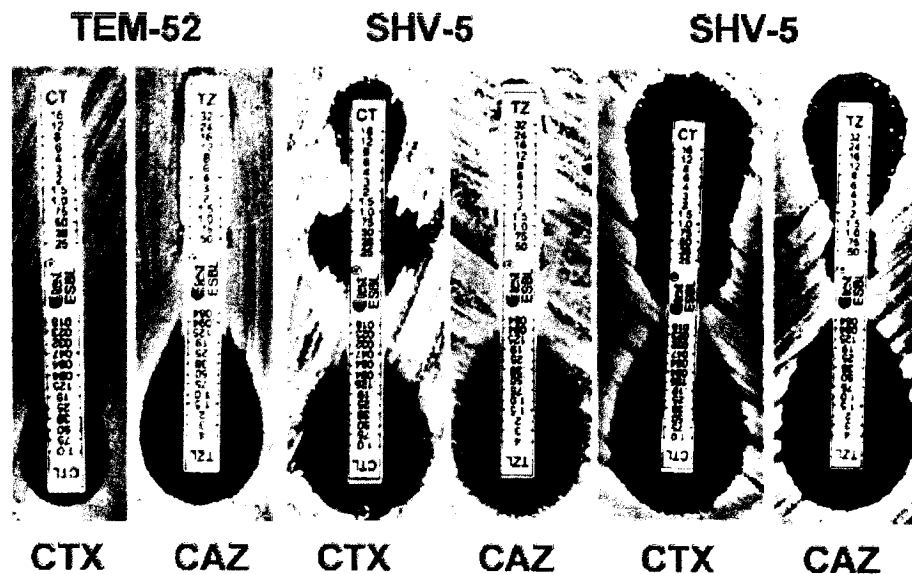


Figure 25 : Technique d'E-test chez *E. coli* (Sturenburg and Mack, 2003).

### II.6.5.3. PCR

La PCR est la méthode moléculaire la plus facile et la plus utilisée pour détecter la présence des enzymes appartenant à la famille des  $\beta$ -lactamases avec des amorces spécifique d'oligonucléotide, pour un gène de  $\beta$ -lactamase à détecter (Shah *et al.*, 2004). Par exemple, chez *P. aeruginosa*, la PCR de screening utilisant une série de paires d'amorces pour la détection des gènes des différents types de  $\beta$ -lactamases, ne permet pas de faire la différence entre les enzymes à spectre limité et celles à spectre étendu d'un même type. Seuls les profils de macrorestriction du produit de PCR ou le séquençage peuvent montrer cette différence. Les isolats qui contiennent plus d'une BLSE de la même famille peuvent entraîner une certaine confusion (Muller, 2004 ; Blagui *et al.*, 2009).

### II.6.5.4. PCR (RFLP) (ACP : amplification en chaîne par polymérase)

Une autre approche pour la caractérisation moléculaire de gène  $\beta$ -lactamase TEM était d'ajouter l'analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction à la PCR (PCR-RFLP). Dans ce test, les produits de PCR amplifiés ont été soumis à une digestion avec plusieurs endonucléases de restriction, et les fragments obtenus ont été séparés par électrophorèse. Les

tailles des fragments générés par chaque enzyme de restriction indiquent des mutations ponctuelles au sein du gène structural  $bla_{TEM}$ . Un certain nombre de tests différents ont été proposés pour la détection et l'identification des dérivés SHV. Le plus simple de ces tests a été suggéré par Nüesch-Inderbinen *et al.* et l'emploi de PCR-RFLP (Shah *et al.*, 2004).

#### II.6.5.5. PCR (SSCP : Polymorphisme de conformation des simples brins)

Une autre méthode utilisée pour caractériser les BLSE de type SHV est l'analyse par polymorphisme de conformation des simples brins (PCR-SSCP) ; acronyme de l'anglais « single strand conformation polymorphism ». Cette méthode a été utilisée pour détecter la mutation d'une seule base à des endroits spécifiques dans le gène  $bla_{SHV}$ . Dans ce test, un amplimère 475-pb est généré en utilisant des amorces oligonucléotidiques qui sont internes à la séquence codante du gène  $bla_{SHV}$ , digéré à l'aide de l'enzyme de restriction PstI. Les fragments sont ensuite dénaturés et séparés sur un gel de polyacrylamide à 20%. Les gènes de SHV-1, -2, -3, -4, -5 et -7 peuvent être identifiés par le profil électrophorétique de l'amplimère digéré (Shah *et al.*, 2004).

### II.7. Génétique des $\beta$ -lactamases

Les gènes codant les  $\beta$ -lactamases peuvent être situés sur le chromosome bactérien, sur des plasmides, ou sur des transposons. Un nombre de gènes ont été découverts sur des intégrons, qui sont des éléments génétiques de longueur variable qui contiennent un gène d'intégrase (*int*) conservé à l'extrémité 5', des cassettes de gène avec d'autres gènes de résistance aux antibiotiques, et un site d'intégration pour la cassette de gène, *attI*. Les éléments génétiques mobiles qui contiennent des intégrons sont la source importante pour la diffusion des gènes *bla* et pour la dissémination d'autres gènes de résistance. Les intégrons ne sont pas mobiles ; ils sont intégrés dans des éléments génétiques mobiles (plasmides, transposons) qui permettent leur mouvement (Babic *et al.*, 2006). Les gènes codant les  $\beta$ -lactamases de type TEM-1 et TEM-2 sont portés par des transposons Tn3, de même que les gènes codant certaines BLSE de type TEM (figure 26). Le gène codant SHV-1 est trouvé sur le chromosome de la plupart des souches *K. pneumoniae*. Les gènes de SHV se produisent également sur les plasmides transmissibles (Jacoby and Munoz-Price, 2005).

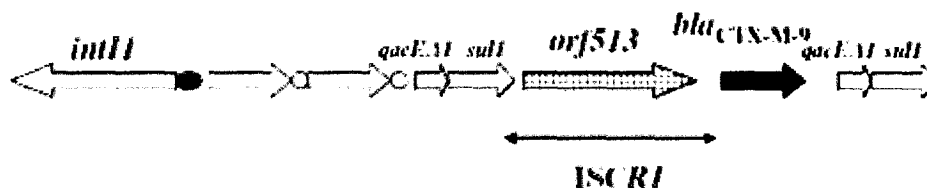


**Figure 26 :** Transposon Tn3 code les  $\beta$ -lactamase de type TEM-1 (Jacoby and Munoz-Price, 2005).

Le gène  $bla_{SHV-5}$  d'origine plasmidique identifié chez *Salmonella typhimurium* isolé en Grèce avait été acquis, ce locus est limité par deux éléments IS26 insérés dans la même orientation. L'élément IS26 situé à l'extrémité 5' de  $bla_{SHV-5}$  a été associé à l'extrémité 5' d'une structure intégron de classe 1 hébergé cinq cassettes de gènes, y compris un système d'encodage de la métallo- $\beta$ -lactamase VIM-1. Il est probable que l'élément IS26 identifié en aval de  $bla_{SHV-5}$  avait été à l'origine de son acquisition par un mécanisme de recombinaison homologue et non par la transposition (Poirel *et al.*, 2012).



Certains nouveaux gènes (CTX-M) sont situés directement en aval de certaines séquences d'insertion comme ISEcp1 qui porte un promoteur. Ces séquences d'insertion ont été identifiées dans la liaison avec les gènes codant pour des enzymes de CTX-M-1, CTXM-2 et CTX-M-9. L'ISEcp1 appartient à la famille des IS1380 et il a été démontré qu'elle mobilise les gènes  $bla_{\text{CTX-M}}$  par un processus particulier de transposition (Poirel *et al.*, 2012). Ces éléments d'insertion on les observe dans des structures de type intégron, soit comme « cassette » (VEB-1, IBC-1, GES-1 et GES-2). Donc sous la dépendance des promoteurs situés a l'extrémité 3' du gène de l'intégrase, ou encore intercalés au sein d'une duplication de l'extrémité 3' conservée de l'intégron (figure 27) mais avec leur propre promoteur (CTX-M). Dans cette dernière situation, on observe souvent de part et d'autre du gène de la  $\beta$ -lactamase, des régions qui correspondent au chromosome de la progéniture (Arlet and Philippon, 2003).



**Figure 27** : Intégron In60 code les  $\beta$ -lactamases de type CTX-M-9 (Poirel *et al.*, 2008).

# *Conclusion*

### **Conclusion**

Les  $\beta$ -lactamines sont les antibiotiques les plus fréquemment prescrits, ils inhibent la biosynthèse du peptidoglycane ; principal constituant de la paroi bactérienne. Elles inactivent les PLPs, enzymes indispensables à la réticulation de cette macromolécule. Ces antibiotiques sont repartis en quatre groupes : les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes et les monobactames et les inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases. Le rôle des  $\beta$ -lactamines comme traitement fondamental des infections a été ébranlé par l'émergence des  $\beta$ -lactamases (la résistance enzymatique aux  $\beta$ -lactamines). La production de  $\beta$ -lactamases est le mécanisme essentiel de résistance aux  $\beta$ -lactamines chez de nombreuses bactéries. La classification moléculaire tient compte de la structure des différentes  $\beta$ -lactamases et les divise en quatre groupes, classe A, C, D (serine enzymes) et B (métallo-enzymes). La classification fonctionnelle plus complète et plus récente, reflète le spectre d'activité de l'enzyme et répartit les  $\beta$ -lactamases en quatre groupes 1 à 4. Les gènes qui codent pour les  $\beta$ -lactamases sont situés soit sur des plasmides, soit sur le chromosome. Ils peuvent être intégrés dans des transposon et les intégrons.

Les BLSE hydrolysent la majorité des  $\beta$ -lactamines. La plus part des ces enzymes sont les dérivées des TEM et SHV. Des méthodes spécifiques de détection des BLSE doivent être appliquées au laboratoire (double disque, E-test...). Elles sont basées sur le fait que les BLSE sont inhibées par l'acide clavulanique; ainsi une augmentation de l'activité des céphalosporines de troisième et quatrième génération en présence d'acide clavulanique (test de synergie). Les organismes résistants posent d'importants problèmes aux microbiologistes. Il est urgent de mieux comprendre l'épidémiologie et les méthodes de contrôle de ces organismes pour que des stratégies efficaces et rentables fondées sur des preuves scientifiques puissent être appliquées, afin de contrôler leur dissémination et de réduire leur prévalence.

*Références  
bibliographiques*

## *Références bibliographiques*

1. **Al-Jasser A. A.** (2006). Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases (ESBLs): A Global Problem. *Kuwait Medical Journal*, **38** (3): 171-185.
2. **Arlet G. and Philippon A.** (2003). Les nouvelles  $\beta$ -lactamases à l'aube du troisième millénaire. *Revue Française des Laboratoires*, **352**: 41- 55.
3. **Babic M., Hujer A. M. and Bonomo R. A.** (2006). What's new in antibiotic resistance? Focus on  $\beta$ -lactamases. *Drug Resistance Updates*, **9**: 142- 156.
4. **Bebrone C.** (2007). Metallo- $\beta$ -lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. *Biochemical Pharmacology*, **74**: 1686-1701.
5. **Blagui S. K., Achour W., Abdeladhim A. and Ben Hassen A.** (2009). Identification of SHV-type extended spectrum  $\beta$ -lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* by PCR-restriction fragment length polymorphism and insertion site restriction-PCR. *Pathologie Biologie*, **57**: 420-424.
6. **Bingen E.** (1996). Les nouvelles céphalosporines. *Archive Pédiatrie*, (1): 295-297.
7. **Birnbaum J. and Vervloet D.** (1997). Allergie aux pénicillines. *Revue Française Allergol*, **37**(1): 29-35.
8. **Bonomo R. A. and Rice L. B.** (1999). Inhibitor resistant class a  $\beta$ -lactamases. *Frontiers in Bioscience*, **4**: 34-41.
9. **Bradford P. A.** (2001). Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important Resistance threat. *Clinical Microbiology Reviews*, **14** (4): 933-951.
10. **Brion J. D.** (1992). *Médicaments antibiotique, traité de chimie thérapeutique*. Edition Technologie et Documentation, Paris, P : 39, 43, 53, 55.
11. **Bryskier A.** (1999). Antibiotiques et agents antibactériens: classification et relation structure activité. *In: Antibiotiques, agents antibactériens et antifongiques*. Edition Ellipses, Paris, P: 54-65.
12. **Bush K., Jacoby G. A. and Medeiros A. A.** (1995). A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **39** (6): 1211-1233.
13. **Bush K.** (2009). *The Importance of  $\beta$ -Lactamases to the Development of New  $\beta$ -Lactams in: Antimicrobial Drug Resistance*. Edition Humana Press, New York, P: 135-144.
14. **Bush K. and Jacoby G. A.** (2010). Updated Functional Classification of  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy*, **54** (3): 969-976.

15. **Carrer A. and Nordmann P.** (2011). *Klebsiella pneumoniae CTX-M-15* : vers une modification de l'épidémiologie des  $\beta$ -lactamases à spectre étendu. *Pathologie Biologie*, **59**: 133-135.
16. **Cattoir V. and Daurel C.** (2010). Quelles nouveautés en antibiothérapie ?. *Médecine et Maladies infectieuses*, **40** : 135-154.
17. **Cavallo J. D., Fabre R., Jehl F., Rapp C. and Garrabé E.** (2004).  $\beta$ -lactamines. *EMC-Maladies Infectieuses*, **1**: 129-202.
18. **Coleman K.** (2006). Extending the life of  $\beta$ -lactam antibiotics: New  $\beta$ -lactamase inhibitors. *Drug Discovery Today : Therapeutic Strategies*, **3** (2): 183-188.
19. **Cuzon G., Naas T. and Nordmann P.** (2010). Carbapénèmases de type KPC : quel enjeu en microbiologie clinique ?. *Pathologie Biologie*, **58**: 39-45.
20. **Dabernat H., Seguy M. and Delmas C.** (1998). Activité in vitro du cefpodoxime et de sept autre  $\beta$ -lactamines vis-à-vis de 134 souches d'*Haemophilus influenzae* de phénotype de résistance variés isolées d'otites et d'autres infections en 1996. *Médecine et Maladies Infectieuses*, **28**: 438-41.
21. **Duval J. and Soussy C.J.** (1990). *Antibiothérapie*. 4<sup>e</sup> Edition Masson, Paris, P : 1-188.
22. **Eberlin T.** (1994). *Les antibiotiques classifications, mode d'action, utilisation thérapeutique*. Edition Nathan, Paris, P: 1-28.
23. **Essack S. Y.** (2001). The development of  $\beta$ -lactam antibiotics in response to the evolution of  $\beta$ -lactamases. *Pharmaceutical Research*, **18** (10): 1391-1399.
24. **Faure S.** (2008). Les céphalosporines et apparentés. *Actualités Pharmaceutiques*, (477) :41-47.
25. **Ferraro M. J., Granato P. A., Morello J. A. and Zabransky R. J.** (1997). Fourth-Generation cephalosporins. *Clinical Microbiology Newsletter*, **19** (17): 129-136.
26. **Fisher J. F., Meroueh S. O. and Shahriar Mobashery.** (2005). Bacterial resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics: compelling opportunism. *Chemical Reviews*, **105**: 2-393.
27. **Frere J. M.** (1995).  $\beta$ -lactamases and bacterial resistance to antibiotics. *Molecular Microbiology*, **16** (3): 385-395.
28. **Galleni M., Lamotte-Brasseur J., Rossolini G.M., Spencer J., Dideberg O. and frère J.M.** the metallo- $\beta$ -lactamase working group. (2001). Standard numbering scheme for class B  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **45** (3): 660-663.
29. **Gaudy C. and Buxeraud J.** (2005). *Antibiotiques: pharmacologie et thérapeutique*. Edition Collection Pharma, Paris, P: 1-269.

30. **Giraud-Morin C. and Fosse T.** (2008). Évolution récente et caractérisation des entérobactéries productrices de BLSE au CHU de Nice (2005-2007). *Pathologie Biologie*, **56**: 417-423.
31. **Gniadkowski M.** (2008). Evolution of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases by mutation. *Clinical Microbiology and Infection*, **14** (1): 11-32.
32. **Goodman-Gilman A.** (1998). Les bases pharmacologiques de l'utilisation des médicaments. Edition MC crow- Hill companies, New York, P: 1085-1091.
33. **Hall B. G. and Barlow M.** (2004). Evolution of the serine  $\beta$ -lactamases: past, present and future. *Drug Resistance Updates*, **7**: 111-123.
34. **Hamdad F., Donda F., Laurans G., Canarelli B, Rousseau F., Biendo M., Thomas D and Eb F.** (2006). Performances des différentes méthodes de détection de la résistance à l'oxacilline de souches atypiques de *Staphylococcus aureus*. *Pathologie Biologie*, **54**: 447-452.
35. **Hata M., Fujii Y., Tanaka Y., Ishikawa H., Ishii M., Neya S., Tsuda M. and Hoshino T.** (2006). Substrate deacylation mechanisms of serine  $\beta$ -lactamases. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **29** (11): 2151-2159.
36. **Heinz U. and Adolph H. W.** (2004). Metallo- $\beta$ -lactamases: two binding sites for one catalytic metalion?. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **61**: 2827-2839.
37. **Heritage J., M'Zali F. H., Gascoyne-Binzi D. and Hawkey P. M.** (1999). Evolution and spread of SHV extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in gram-negative bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **44**: 309-318.
38. **Jacoby G. A.** (2006).  $\beta$ -lactamase Nomenclature. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **50** (4): 1123-1129.
39. **Kezzal K.** (1993). Les antibiotiques : Classification, Mode d'action, résistances, action in vitro. Collection le cours de médecine. Place centrale de ben Aknoun (Alger), P : 2.
40. **Labadene H., Bakour R., Messai Y., Da Costa A. and Arlet G.** (2009). Détection des gènes bla<sub>CTX-M-14</sub> et aac(3)-II chez *Salmonella enterica* sérotype Kedougou en Algérie. *Médecine et Maladies Infectieuses*, **39**: 806-807
41. **Lavigne J. P., Sotto A., Merle C., Jourdan J., Soussy C. J. and Sirot D.** (2002). Résistance enzymatique d'*Escherichia coli* aux  $\beta$ -lactamines et prévalence en clinique. *Pathology and Biology*, **50**: 388- 93.
42. **Livermor D. M.** (1995).  $\beta$ -Lactamases in laboratory and Clinical Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, **8** (4): 557-584.
43. **Majiduddin F. K., Materon I.C. and Palzkill T. G.** (2002).Molecular analysis of  $\beta$ -lactamase structure and function. *International Journal of Medical Microbiologie*, **292**: 127- 137.

44. **Mérens A., Delacoura H., Plésiatb P., Cavalloc J. D. and Jeannotb K.** (2011). *Pseudomonas aeruginosa* et résistance aux antibiotiques. *Revue francophone des laboratoires*, (435): 49-62.
45. **Mimoz O.** (2001). Administration des céphalosporines dans les infections sévères à bacilles à Gram négatif. *Médecine Maladies Infectieuses*, **31**: 583-90.
46. **Moulin M. and Coquerel A.** (2007). *Pharmacologie*. Edition Masson (2<sup>e</sup> édition), Paris, P : 167.
47. **Mouton Y., Bingen E., Debooscher Y. and Dubreuil L.** (2000). Antibiotiques antiviraux anti-infectieux. *John libbey eirotext*, Paris, P : 85, 97, 98.
48. **Muller M. P.** (2004). Résistance des bactéries Gram-négatif due aux  $\beta$ -lactamases *Maladies. Maladies Infectieuses et Microbiologie*, **3**: 117-121.
49. **Naas T., Poirel L. and Nordmann P.** (2008). Minor extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Clinical Microbiology and Infection*, **14** Suppl.1: 42-52.
50. **Neal M.** (2003). *Pharmacologie médicale*. Edition Française de Boeck (2<sup>e</sup> édition). Paris, P : 83.
51. **Nordmann P. and A. Carrer.** (2010). Les carbapénèmases des entérobactéries. *Archives de Pédiatrie*, **17**: 154-162.
52. **Nordmann P., Dortet L. and Poirel L.** (2012). Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm!. *Trends in Molecular Medicine*, **18** (5): 263-272.
53. **Page M. I. and Laws A.P.** (1998). The mechanism of catalysis and the inhibition of  $\beta$ -lactamases. *Chemical Communication*. Feature article, 1609-1615.
54. **Page M. G. P.** (2008). Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: structure and kinetic mechanism. *Clinical Microbiology and Infection*, **14**(1): 63-74.
55. **Page M. I. and Badarau A.** (2008). The Mechanisms of catalysis by metallo  $\beta$ -lactamases. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, doi:10.1155/2008/576297.1-14.
56. **Paterson1 D. L and Bonomo R-A.** (2005). Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases: a Clinical Update. *Clinical Microbiology Reviews*, **18** (4): 657-686.
57. **Philippon A. and Arlet G.** (2006).  $\beta$ -Lactamases de bacilles à Gram négatif : le mouvement perpétuel !. *Annales de Biologie Clinique*, **64** (1): 37-51.
58. **Pitout JD. D., Nordmann P., Laupland K. B. and Poirel L.** (2005). Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) in the community. *Journal Antimicrob Chemother*, **56**: 52-59.
59. **Poirel I., Naas T. and P. Nordmann.** (2008). Genetic support of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Clinical Microbiology and Infection*, **14** Suppl. 1: 75-81.



**Réalisé par : Boucetta Zeyneb, Hechiche Hanifa, Merimeche Aida**

**Production du  $\beta$ -lactamases par les bactéries et mode d'action**

**Résumé**

Les  $\beta$ -lactamines sont les antibiotiques les plus utilisés pour le traitement de diverses infections bactériennes. Elles sont classées en différents sous groupes selon la structure du noyau de base. Les bactéries ont développé différents mécanismes pour contrecarrer l'action des  $\beta$ -lactamines. La production de  $\beta$ -lactamases est le mécanisme le plus répandu. Ces enzymes sont réparties en quatre groupes selon la structure en acides aminés (classification d'Ambler) et quatre groupe selon la fonction de l'enzyme (classification de Bush), parmi ces enzymes les BLSE capable d'hydrolyser la majorité des  $\beta$ -lactamines, la plus part des BLSE sont le résultat de mutations génétiques de  $\beta$ -lactamases naturelles, en particulier de TEM-1, TEM-2 et SHV-1.

**Mots-clés :**  $\beta$ -lactamines, la résistance aux  $\beta$ -lactamines,  $\beta$ -lactamases,  $\beta$ -lactamases à spectre élargi.

**Abstract**

The  $\beta$ -lactams are the most used antibiotics for the treatment of different bacterium infections; they are classified in different under-groups according to the structure of base kernel. The bacteria developed different mechanisms for thwarting the  $\beta$ -lactams action. The  $\beta$ -lactamases production is the most extended mechanism; their enzymes are divided into four groups according to the structure of amino acids (Ambler classification) and four groups according to the enzyme function (Bush classification), among these enzymes the  $\beta$ -lactam with widen spectrum is able to hydrolyze the majority of  $\beta$ -lactams, the most of BLSE are the results of the genetic changes of natural  $\beta$ -lactamases, particularly of TEM-1, TEM-2 and SHV-1.

**Keywords :**  $\beta$ -lactams, the  $\beta$ -lactams resistance,  $\beta$ -lactamases,  $\beta$ -Lactam with widen spectrum.

**ملخص**

تعدّ بيبتالاکتامين من المضادات الأكثر استعمالا لمعالجة مختلف الإصابات البكتيرية، فهي مصنفة ضمن عدة مجموعات فرعية حسب تشکيلة النواة الأساسية. وقد وضعت البكتيريا عدة آليات من أجل التصدي لعمل بيبتالاکتامين. ويعد انتاج بيبتالاکتامااز من الآليات الأكثر انتشارا، فقد تم تصنيف أنزيماته إلى أربع مجموعات تبعا لتركيبية الاحماض الأمينية (تصنيف أمبلر) وإلى أربع مجموعات حسب وظيفة الأنزيم (تصنيف بوش)، ومن بين هاته الأنزيمات نجد بيبتالاکتامااز ذو الطيف الواسع القادر على اماهة معظم بيبتالاکتامين. إن أغلبية بيبتالاکتامااز ذو الطيف الواسع تمثل نتائج التحولات الوراثية لبيبتالاکتامااز الطبيعية، وبالأخص TEM-1, TEM-2, SHV-1.

**الكلمات المفتاحية :** بيبتالاکتامين، مقاومة بيبتالاکتامين، بيبتالاکتامااز، بيبتالاکتامااز ذو الطيف الواسع .

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de La Recherche Scientifique

كلية علوم الطبيعة والحياة

المكتبات

رقم الجرد : A.826

Université de Jijel

Faculté des Sciences Exactes et Sciences  
de la Nature et de La vie

Département de Biologie Moléculaire  
et Cellulaire



جامعة جيجل

كلية العلوم الدقيقة وعلوم الطبيعة والحياة

قسم البيولوجيا الجزيئية والخلوية

## Mémoire De Fin D'études Pour L'obtention Du Diplôme Des Etudes Supérieures en Biologie

Option : Microbiologie

Intitulé

Production des  $\beta$ -lactamases par les  
bactéries et mode d'action

Membres du Jury :

Examinatrice : D<sup>r</sup> Akroum S.

Encadreur : M<sup>lle</sup> Yousfi K.

Réalisé par :

Boucetta Zeyneb

Hechiche Hanifa

Merimeche Aida



Année Universitaire : 2011-2012

## ***Remerciements***

*Nous* tenons à remercier Dieu, le tout puissant, qui nous a aidé à réaliser ce travail.

*Nous* remercions très sincèrement notre encadreur Yousfi Khadidja, d'avoir accepté d'être rapporteur de ce mémoire, nous sommes très reconnaissantes en vers elle pour sa constante disponibilité.

*Nos* remerciements vont également D<sup>r</sup> Akroum S, d'avoir accepter de faire partie des membres de notre jury. Nous sommes très honorées de sa présence, qu'il trouve ici le témoignage de notre profonde reconnaissance.

*Nous* remercions tous les enseignants du département de Biologie Moléculaire et Cellulaire de l'université de Jijel particulièrement nos professeurs qui ont dédoublé leurs efforts pour nous transmettre le savoir et durant notre cursus de formation.

*Nous* n'omettons pas de remercier nos parents ; de nous avoir encouragés et conseillés.

*Enfin* nous remercions toute personne qui a participé à la réalisation de ce travail.



Examen : Dr. AKROUM S.



# ***Sommaire***

# SOMMAIRE

## Liste des abréviations

## Liste des figures et des tableaux

|                                                         |    |
|---------------------------------------------------------|----|
| <b>Introduction</b> .....                               | 01 |
| <b>Chapitre I : <math>\beta</math>-lactamines</b>       |    |
| I.1. Définition des $\beta$ -lactamines .....           | 02 |
| I.2. Historique des $\beta$ -lactamines.....            | 02 |
| I.3. Classification et structure.....                   | 03 |
| I.3.1. Dérivés de l'acide 6-amino-pénicillanique.....   | 03 |
| I.3.1.1. Pénames (pénicillines).....                    | 03 |
| a) Pénicilline G.....                                   | 04 |
| b) Pénicilline V.....                                   | 04 |
| c) Pénicilline antistaphylococciques.....               | 04 |
| d) Pénicilline a large spectre.....                     | 05 |
| e) Amidinopénicillines.....                             | 06 |
| f) Pénicillines sulfone.....                            | 06 |
| I.3.1.2. Pénèmes (carbapénèmes).....                    | 06 |
| I.3.1.3. Clavames(Oxapénames).....                      | 07 |
| I.3.2. Dérivés de l'acide7-amino-céphalosporanique..... | 07 |
| I.3.2.1. Céphalosporines de première génération .....   | 08 |
| I.3.2.2. Céphalosporines de deuxième génération .....   | 09 |
| I.3.2.3. Céphalosporines de troisième génération.....   | 09 |
| I.3.2.4. Céphalosporines de quatrième génération .....  | 10 |
| I.3.3. Monobactames.....                                | 10 |
| I.4. Mode d'action des $\beta$ -lactamines.....         | 10 |
| I.4.1. Paroi bactérienne.....                           | 11 |
| I.4.2. Mécanisme d'action des $\beta$ -lactamine.....   | 11 |
| I.5. Utilisation des $\beta$ -lactamines.....           | 12 |
| I.5.1. Pénicillines.....                                | 12 |
| I.5.2. Céphalosporines.....                             | 13 |
| <b>Chapitre II : <math>\beta</math>-lactamases</b>      |    |
| II.1. Définition.....                                   | 14 |
| II.2. Nomenclature.....                                 | 14 |
| II.3. Classification et structure.....                  | 14 |

|                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------|----|
| II.3.1. Classification moléculaire des $\beta$ -lactamases.....             | 15 |
| II.3.1.1. $\beta$ -lactamases à serine.....                                 | 15 |
| a) $\beta$ -lactamases de classe A.....                                     | 15 |
| b) $\beta$ -lactamases de Classe C.....                                     | 16 |
| c) $\beta$ -lactamases de classe D.....                                     | 17 |
| II.3.1.2. Métallo- $\beta$ -lactamases.....                                 | 17 |
| II.3.2. Classification fonctionnelle des $\beta$ -lactamases .....          | 19 |
| II.3.2.1. Groupe 1 .....                                                    | 19 |
| II.3.2.2. Groupe 2.....                                                     | 19 |
| II.3.2.3. Groupe 3.....                                                     | 20 |
| II.3.2.4. Groupe 4.....                                                     | 20 |
| II.4. Mécanisme d'action de $\beta$ -lactamases.....                        | 20 |
| II.5. Enzymologie des $\beta$ -lactamases.....                              | 21 |
| II.6. $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BLSE).....                      | 22 |
| II.6.1. Définition des BLSE.....                                            | 22 |
| II.6.2. Différents types de BLSE.....                                       | 22 |
| II.6.2.1. Type TEM.....                                                     | 22 |
| II.6.2.2. Type SHV.....                                                     | 23 |
| II.6.2.3. Type CTX-M.....                                                   | 23 |
| II.6.2.4. Type OXA.....                                                     | 23 |
| II.6.2.5. Autres types de BLSE.....                                         | 23 |
| II.6.3. Epidémiologie des BLSE.....                                         | 24 |
| II.6.4. Les facteurs de risques.....                                        | 25 |
| II.6.5. Détection de BLSE.....                                              | 25 |
| II.6.5.1. Double disque (DD-test).....                                      | 25 |
| II.6.5.2. E-test.....                                                       | 26 |
| II.6.5.3. PCR.....                                                          | 27 |
| II.6.5.4. PCR (RFLP : ACP : amplification en chaîne par polymérase) .....   | 27 |
| II.6.5.5. PCR (SSCP : Polymorphisme de conformation des simples brins)..... | 27 |
| II.7. Génétique des $\beta$ -lactamases.....                                | 27 |
| <b>Conclusion</b> .....                                                     | 29 |
| <b>Références bibliographiques</b> .....                                    | 30 |

## Liste des abréviations

- 7-ACA:** 7-Amino-céphalosporanique
- ACP:** Amplification en chaîne par polymérase
- ACT-1:** AmpC type
- ADN:** Acide désoxyribonucléique
- AER:** *Aeromonas*
- Ala:** Alanine
- ARI-1:** *Acinetobacter* resistance impenem
- ASb:** *Aeromonas sobria*
- Asn:** Asparagine
- Asp:** Aspartate
- attI:** la cassette de gène
- BcII:** *Bacillus cereus* type II
- BES:** Brazilian extended-spectrum  $\beta$ -lactamase
- Bla:**  $\beta$ -lactamase
- bla:** gène de  $\beta$ -lactamase
- $\beta$ -lactamine:** Bêta- lactamine
- bp:** paire de base
- BLSE:**  $\beta$ -Lactamases à spectre élargi
- C1G:** Céphalosporines de première génération
- C2G:** Céphalosporines de deuxième génération
- C3G:** Céphalosporines de troisième génération
- C4G:** Céphalosporines de quatrième génération
- CARB:** Carbénicillinasés
- CAU-1:** *Caulobactrum crescentus*
- CcrA:** Carbapenem cephamycin resistance classe A
- Cep A:** Cephalosporinase de classe A
- CGB-1:** *Chryseobacterium gleum* classe B
- CMI:** Concentration minimal inhibitrice
- CMY-1:** Céphamycinase
- Cph:** Cephalosporinase
- CT/CTL:** Cefotaxime/Clavulanate



**P99:** Souche P99 (*Enterobacter cloacae*)

**pCMB:** *p* Chloromercuribenzoate

**PCR:** Polymerase chain reaction

**PER:** *Pseudomonas* extended resistance

**PIT:** Pitton

**PLP:** Protéines liant la pénicilline

**RFLP:** Restriction fragment length polymorphism

**RTG:** Arginine, Thréonine, Glycine

**S:** Substrat

**Ser:** Serine

**Sfh-1:** *Serratia fonticola* carbapenem hydrolase

**SFO-1:** *Serratia fonticola*

**SHV:** SulfHydryl reagent Variable

**SME:** *Serratia marcescens*

**SSCP:** Polymorphis single-strand conformational polymorphism

**TEM:** *Temoneira*

**THIN-B:** *Janthinobacterium crescentus*

**TLA:** Tlahuicas-tribu indienne

**Tn:** Transposon

**TRI :** TEM Résistantes aux Inhibiteurs

**TUS:** *Myroides odoratus*

**TZ:** Ceftazidime

**TZL:** Ceftazidime combiné à l'acide clavulanique

**VEB:** Vietnamese extended spectrum  $\beta$ -lactamase

**VIM:** Verona imipenemase

**Vmax:** Vitesse maximale

**X-ray:** rayon X

**Ybx:** Product of an open reading frame of unknown function (hence Y) in position bx on the *B. subtilis* chromosome

**YO:** Youville Hospital

**Zn:** Zinc



# Liste des figures et des tableaux

## Liste des figures

|                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figure 01</b> : Structure du noyau $\beta$ -lactame.....                                              | 02 |
| <b>Figure 02</b> : Structure chimique de l'acide 6-amino-pénicillanique.....                             | 03 |
| <b>Figure 03</b> : Structure chimique de pénicilline.....                                                | 03 |
| <b>Figure 04</b> : Structure chimique de la pénicilline G.....                                           | 04 |
| <b>Figure 05</b> : Structure chimique de la pénicilline V.....                                           | 04 |
| <b>Figure 06</b> : Structure des pénicillines M.....                                                     | 05 |
| <b>Figure 07</b> : Structure chimique de N-acylpénicillines.....                                         | 05 |
| <b>Figure 08</b> : Structure chimique de la mécillinam.....                                              | 06 |
| <b>Figure 09</b> : Structure chimique des pénicillines sulfones.....                                     | 06 |
| <b>Figure 10</b> : Structure chimique de la carbapénèmes.....                                            | 07 |
| <b>Figure11</b> : Structure chimique de l'acide clavulanique.....                                        | 07 |
| <b>Figure12</b> : Structure chimique de l'acide 7-amino-céphalosporanique.....                           | 08 |
| <b>Figure13</b> : Structure chimique de céphalothine et de céfazoline .....                              | 08 |
| <b>Figure 14</b> : Structure chimique de céfoxitine.....                                                 | 09 |
| <b>Figure 15</b> : Structure chimique de céfotaxime.....                                                 | 09 |
| <b>Figure 16</b> : Structure chimique de céfépime et céfpirome.....                                      | 10 |
| <b>Figure17</b> : Structure chimique de monobactame.....                                                 | 10 |
| <b>Figure 18</b> : Mécanisme d'action des $\beta$ -lactamines.....                                       | 11 |
| <b>Figure 19</b> : Structure des $\beta$ -lactamases de classe A.....                                    | 15 |
| <b>Figure 20</b> : Structure de métallo- $\beta$ -lactamase de groupe B1.....                            | 17 |
| <b>Figure 21</b> : Structure de métallo- $\beta$ -lactamase de groupe B2.....                            | 18 |
| <b>Figure 22</b> : Structure de métallo- $\beta$ -lactamae de groupe B3.....                             | 18 |
| <b>Figure 23</b> : Mécanisme d'hydrolyse du cycle $\beta$ -lactame par $\beta$ -lactamases à sérine..... | 21 |
| <b>Figure 24</b> : Technique du double disque chez <i>K.pneumoniae</i> .....                             | 26 |
| <b>Figure 25</b> : Technique d'E-test chez <i>E. coli</i> .....                                          | 26 |
| <b>Figure 26</b> : Transposon TN3 code les $\beta$ -lactamases de type TEM-1.....                        | 28 |
| <b>Figure 27</b> : Intégron In60 code les $\beta$ -lactamases de type CTX-M-9.....                       | 28 |

## Liste des tableaux

|                                                                                                   |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tableau I</b> : Exemples d'antibiotiques appartenant aux 4 générations de céphalosporines..... | 8  |
| <b>Tableau II</b> : Classes moléculaires correspondant aux groupes fonctionnels.....              | 14 |
| <b>Tableau III</b> : Métallo- $\beta$ -lactamases.....                                            | 18 |



# *Introduction*

### **Introduction**

La résistance des bactéries aux antibiotiques est devenue l'un des problèmes les plus importants des thérapeutiques anti-infectieuses dans le monde. Les infections causées par les bactéries résistantes aux antibiotiques sont responsables d'un taux élevé de morbidité et de mortalité, comparé aux infections causées par des bactéries sensibles aux antibiotiques. Les  $\beta$ -lactamines représentent la principale famille d'antibiotiques la plus développée et la plus utilisée. Cette large utilisation est due à leur large spectre d'action, leur faible toxicité, leur efficacité et à leur faible coût pour certaines molécules. Ces antibiotiques sont le plus souvent utilisés dans le traitement des infections. Cependant, différents mécanismes de résistance à ces derniers ont été décrits. Le plus fréquent est la production de  $\beta$ -lactamases.

Les  $\beta$ -lactamases catalysent d'une manière efficace et irréversible la liaison du cycle  $\beta$ -lactame des  $\beta$ -lactamines, donnant un produit biologiquement inactif qui perd totalement son activité antibactérienne. Ces enzymes peuvent être codés par des chromosomes ou des plasmides. Des gènes codant les  $\beta$ -lactamases ont aussi été caractérisés sur des transposons ou des intégrons. Ces derniers facilitent le transfert horizontal des  $\beta$ -lactamases entre des espèces phylogénétiquement éloignées. Plus de 290 types de  $\beta$ -lactamases sont décrites et sont classées suivant leur structure en acides aminés en 4 classes (classification moléculaire) et selon leur spectre d'activité (classification fonctionnelle) en 4 groupes. La plus grande partie des  $\beta$ -lactamases a été mise en évidence chez les bacilles à Gram négatif qui sont par ailleurs responsables de la majorité des infections hospitalières et sont de plus en multirésistants. La dissémination des  $\beta$ -lactamases communes et l'apparition de nouveaux enzymes ou d'enzymes mutants sont reliées directement à l'utilisation abusive des  $\beta$ -lactamines dans les différents domaines ; santé humaine et animale et en agriculture).

Le but de ce travail est l'acquisition d'informations concernant différentes  $\beta$ -lactamases, en se basant sur leur structure et leur spectre d'activité et d'inhibition, et leur aspect génétique. Cela pour une meilleure prise en charge thérapeutique des infections et pour élaborer une stratégie de contrôle de la résistance bactérienne aux  $\beta$ -lactamines.

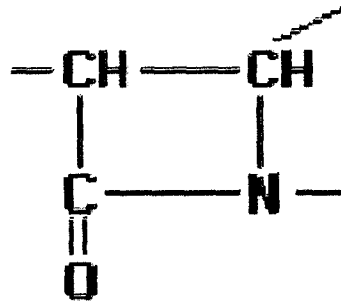
Cette étude, est partagée en deux parties : la première partie donne un aperçu général sur les  $\beta$ -lactamines (Classification, structure, mode d'action et l'utilisation thérapeutique), la deuxième partie présente la résistance des bactéries aux  $\beta$ -lactamines par la production des enzymes  $\beta$ -lactamases en étudiant leur aspect biochimique et génétique.

# *Chapitre I*

## *$\beta$ -lactamines*

### I.1. Définition des $\beta$ -lactamine

Les  $\beta$ -lactamines, sont des substances extraites d'organismes vivants (moisissures et bactéries), elles sont donc initialement d'origine extractive, puis secondairement obtenues par hémisynthèse, c'est-à-dire par adjonction de chaînes latérales sur une structure naturelle « orientée » par le milieu de culture (Moulin and Coquerel, 2007). Ces antibiotiques forment un groupe homogène sur le plan biochimique et sont caractérisés chimiquement par un cycle  $\beta$ -lactame (figure 01) indispensable à l'activité antibiotique, une faible toxicité, associés à un mode d'action fort et se lient sur des protéines de la membrane cytoplasmique dénommées Protéines Liant la Pénicilline (PLP) (Eberlin, 1994 ; Cavallo *et al.*, 2004).



**Figure 01** : Structure du noyau  $\beta$ -lactame (Duval and Soussy, 1990).

La famille des  $\beta$ -lactamines se compose de quatre groupes de molécules : les pénames, les pénèmes, les céphèmes et les monobactames. On doit ajouter les inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases, dont certaines structures sont incluses dans les quatre principaux groupes (Bryskier, 1999 ; Bebrone, 2007).

### I.2. Historique des $\beta$ -lactamines

Historiquement, l'effet antibactérien d'un champignon filamentueux comme *Penicillium* a été observé dès les années 1870 par plusieurs biologistes. Mais c'est à Fleming que l'on doit, en 1929, une étude approfondie de ce phénomène. Après avoir constaté, sur une boîte de milieux gélosés oubliés quelque temps, que, au voisinage d'un champignon contaminant, *Penicillium notatum*, les colonies de *Staphylococcus* étaient partiellement ou totalement lysées, il étudia sur diverses souches bactériennes les effets d'une substance soluble retrouvée dans le filtrat de bouillon de culture (Eberlin, 1994). Alexander Fleming interpréta ce phénomène par la libération par le champignon d'une substance antibactérienne à laquelle il donna le nom de pénicilline (Gaudy and Buxeraud, 2005).

Ce n'était qu'en 1940 qu'une équipe de chercheurs d'Oxford, Florey, Chain et Heatley, réussit à obtenir une pénicilline concentrée, partiellement purifiée et stable. Le premier cas de septicémie à staphylocoque fut traité en 1941 à Oxford et, en 1943, les armées alliées commencèrent à recevoir des quantités importantes de pénicilline. Une fois déterminée la structure biochimique du noyau de base de toutes les pénicillines, l'acide amino-6-pénicillanique en 1959, il fut possible de modifier des molécules d'origine naturelle pour obtenir des antibiotiques semi-synthétiques possédant des propriétés bactériologiques et pharmacologiques encore plus intéressantes. En effet, la résistance de *Staphylococcus aureus* à la pénicilline devient un problème majeur au début des années 1960, affectant l'ensemble des hôpitaux et de plus, à partir de cette époque, les bacilles Gram<sup>-</sup> ont pris une place croissante en pathologie infectieuse. On prépara ainsi des pénicillines résistantes aux pénicillinases du staphylocoque (méthicilline, 1960 ; oxacilline, 1962) et des pénicillines à large spectre actives sur les bactéries Gram<sup>-</sup> comme l'ampicilline (1963) ou la carbénicilline (1970) (Cavallo *et al.*, 2004).

En 1945, Guiseppe Brotzu, a isolé des prélèvements un champignon appelé *Cephalosporium acremonium*, selon l'expérience de chercheur A. Fleming, a montré que le filtrat de culture renferme une substance antimicrobienne active sur des germes Gram<sup>+</sup> et négatif. Sa découverte a passé totalement inaperçue. Dans l'indifférence générale, il a réussi néanmoins en 1948 à intéresser les chercheurs d'oxford, H. Florey et N. Heatley. Le fractionnement du bouillon de culture a permis de séparer tout d'abord un mélange de molécules stéroïdiques appelé « céphalosporines p » (p parce qu'elles sont actives sur les germes Gram<sup>+</sup>, la molécule la plus active étant la céphalosporine p<sub>1</sub> (Gaudy and Buxeraud, 2005).

### I.3. Classification et structure

Les  $\beta$ -lactamines, qu'elles soient naturelles ou produites par héli-synthèse, sont classées en fonction de la nature du noyau entrant dans leur structure de base. La structure de ce dernier, qui comporte toujours le cycle  $\beta$ -lactame, permet de répartir ces produits en trois grands groupes les dérivés de l'acide 6-amino-pénicillanique, les dérivés de l'acide 7-amino-céphalosporanique et les monobactames (Cavallo *et al.*, 2004).

#### I.3.1. Dérivés de l'acide 6-amino-pénicillanique

Selon que le noyau est un pénème, un pénème ou un clavame, diverses substitutions confèrent à la molécule des propriétés et une activité antibactérienne variable qui s'exprime dans les variations du spectre d'activité antibactérienne (Cavallo *et al.*, 2004). Le cycle  $\beta$ -lactame associé à un cycle thiazolidine (Pentagonal) pour former l'acide 6-amino-pénicillanique (figure 02) (Kezzal, 1993).

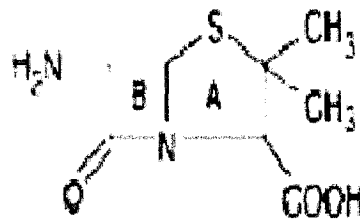


Figure 02 : Structure chimique de l'acide 6-amino-pénicillanique (Cavallo *et al.*, 2004).

#### I.3.1.1. Pénames (pénicillines)

La structure de base des pénicillines comporte un noyau thiazolidine attaché à une  $\beta$ -lactame liant de façon covalente un radical variable selon le composé (figure 03). Le radical détermine le type de pénicilline ainsi que les propriétés antibactériennes et pharmacologiques de la molécule (Kezzal, 1993).

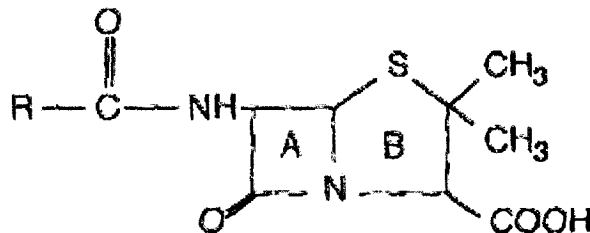


Figure 03 : Structure chimique de pénicilline (Birnbbaum et Vervloet, 1997).

La sous-famille des pénames comprend le groupe des pénicillines à spectre étroit (pénicilline G et V), des méthicillines (méthicilline, oxacilline, cloxacilline, dicloxacilline, flucloxacilline). Des pénicillines à spectre élargi (ampicilline, amoxicilline, ticarcilline) et enfin le groupe des uréidopénicillines (mezlocilline, azlocilline, pipéracilline).

Les antibiotiques appartenant aux groupes des pénicillines à spectre étroit et des méthicillines sont actifs principalement sur les bactéries Gram<sup>+</sup> (*Streptococcus* et *Staphylococcus*). En revanche, les uréidopénicillines, ainsi que les pénicillines à spectre élargi sont actives à la fois contre les bactéries à Gram positif et négatif, notamment *Pseudomonas aeruginosa* et *Proteus mirabilis* (Duval and Soussy, 1990 ; Moulin and Coquerel, 2007).

#### a) Pénicilline G

La benzylpénicilline (pénicilline G) est instable en milieu acide. L'introduction sur la chaîne latérale d'un groupement polaire tel qu'un atome d'oxygène (phénoxpénicillines) ou d'un atome de soufre ne modifie pas l'activité antibactérienne mais augmente la stabilité en milieu acide. La structure de la pénicilline G est représentée dans la figure 04 (Bryskier, 1999).

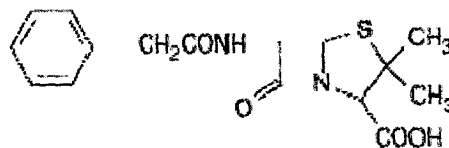


Figure 04 : Structure chimique de la pénicilline G (Cavallo *et al.*, 2004).

La pénicilline G présente plusieurs limites, son spectre d'action est assez étroit. Elle est en principe active sur les coques Gram<sup>+</sup> et Gram<sup>-</sup>, ainsi que sur les bacilles Gram<sup>+</sup>, mais son activité sur les bacilles Gram<sup>-</sup> se limite à quelques germes particuliers tels que *Haemophilus* ou *Moraxella*. De plus, de nombreuses bactéries, sensibles au départ, sont peu à peu devenues résistantes, rendant les résultats thérapeutiques aléatoires (Eberlin, 1994).

#### b) Pénicilline V

Les pénicillines V ou phénoxy méthylpénicillines sont synthétisées pour pallier les inconvénients d'ordre pharmacocinétique de la pénicilline G, par modification de radical (figure 05). Elles sont semi retard et retard, ayant une plus longue durée d'action (Gaudy et Buxeraud, 2005).

La phénoxy méthylpénicilline possède le même spectre que la benzylpénicilline, avec une activité moindre. Elle est stable en milieu acide (Neal, 2003).

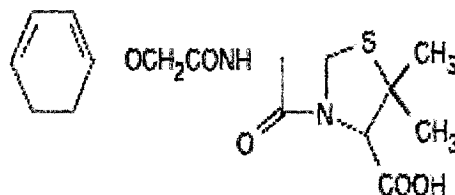


Figure 05 : Structure chimique de la pénicilline V (Cavallo *et al.*, 2004).

#### c) Pénicilline antistaphylococciques

Le spectre antimicrobien est voisin de celui de la pénicilline G. La méticilline est active sur les bactéries à Gram positif, sur les cocci à Gram négatif comme *Neisseria gonorrhoeae* et *Neisseria meningitidis*. Elle est cependant de 20 à 50 fois moins active que la pénicilline G. Elle est stable à l'hydrolyse par les  $\beta$ -lactamases de *S. aureus* et de ce fait elle est active sur ces souches. La méticilline et la nafcilline sont toutes les deux plus stables que les isoxazoles pénicillines qui sont par ordre décroissant la dicloxacilline, l'oxacilline, la cloxacilline et la flucloxacilline (figure 06) (Bryskier, 1999).

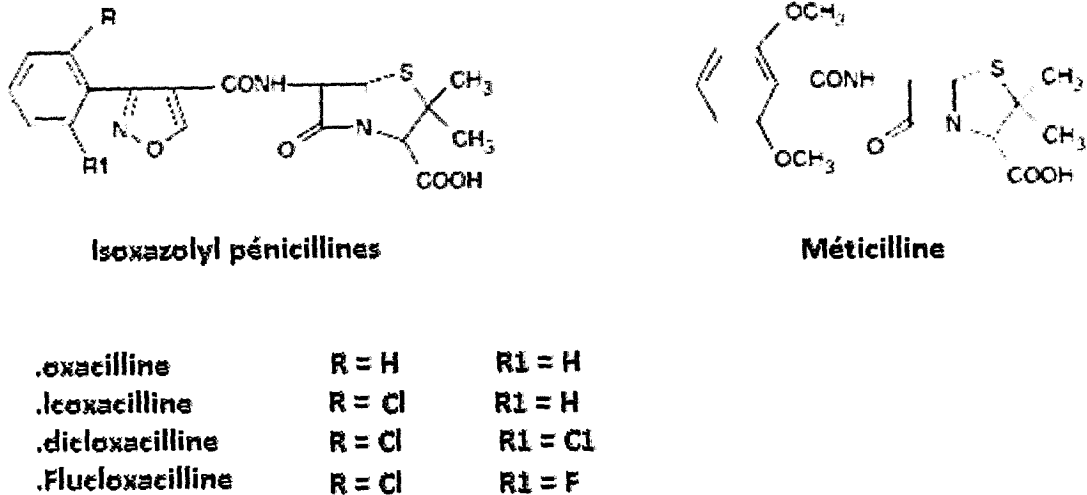


Figure 06: Structure des pénicillines M (Cavallo *et al.*, 2004).

**d) Pénicillines à large spectre**

Ce sont des pénicillines à spectre élargi vers les bacilles Gram<sup>-</sup>, mais détruites par les pénicillinases, celles de staphylocoques et celles de nombreux bacilles à Gram<sup>-</sup>, de sorte que leur efficacité est variable selon les espèces et selon les souches (Duval and Soussy, 1990).

**- Ampicilline et produits voisins (aminopénicillines)**

L'introduction d'un groupement aminé sur la chaîne latérale a permis d'élargir le spectre d'activité de ces pénicillines du groupe A vers les bactéries à Gram<sup>-</sup>, d'où l'appellation de « pénicillines à spectre élargi »

Les aminopénicillines sont actives sur les streptocoques à l'exception de *S. pneumoniae*, mais inactives sur les staphylocoques producteurs de pénicillinases qui représentent la grande majorité des souches (Gaudy and Buxeraud, 2005).

**- N-acylpénicillines (antipyocyaniques)**

Suivant leur structure chimique, on distingue deux groupes (figure 07) :

- les uréidopénicillines : sont représentées par la pipéracilline (éventuellement associée au tazobactam).
- les carboxypénicillines : dont la ticarcilline (associée à l'acide clavulanique) (Gaudy and Buxeraud, 2005).

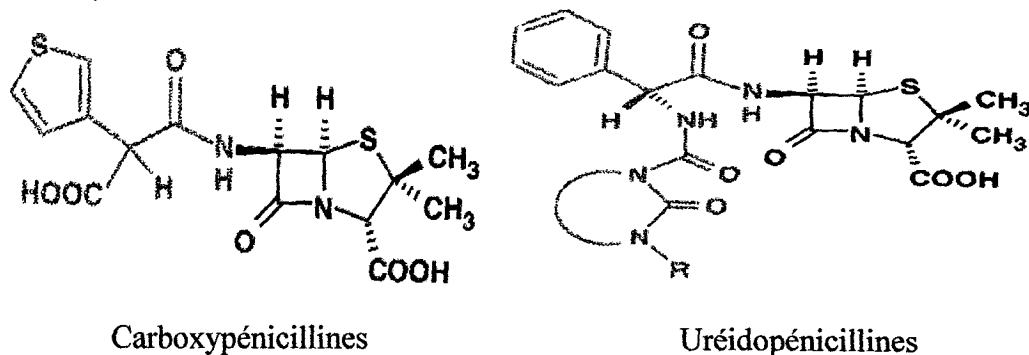


Figure 07 : Structure chimique de N-acylpénicillines (Gaudy and Buxeraud, 2005).

Les N-acylpénicillines sont hydrolysées par les pénicillinases de *S. aureus* et en règle générale elles sont moins actives que la pénicilline G et l'ampicilline sur les cocci et les bactéries Gram<sup>+</sup>,



sauf sur les *Enterococcus* spp où elles possèdent une activité voisine de celle de l'ampicilline. De plus, ces substances douées d'une bonne activité sur les bactéries anaérobies. La pipéracilline est beaucoup plus active que la ticarcilline sur *P. aeruginosa* et *Klebsiella* spp. Cependant, son activité est identique sur les autres bactéries Gram<sup>-</sup> (Bryskier, 1999).

#### e) Amidinopénicillines

Il s'agit de molécules qui possèdent un noyau pénème, mais qui se différencient des pénicillines par une liaison amide en position 6. Le mécillinam se caractérise par la présence d'un noyau azépine fixé sur la liaison amide (figure 08).

Le mécillinam est inactif sur *S. aureus*, *E. faecalis*, et les bactéries Gram<sup>-</sup> non fermentaire comme *P. aeruginosa*, *Alcaligenes* spp et *Flavobacterium*. Son activité sur *S. pneumoniae* et *S. pyogenes* est modérée. Cette molécule est aussi inactive sur *H. influenzae*. L'activité sur les entérobactéries varie en fonction de l'espèce. Elle est bonne sur *E. coli*, *Citrobacter* spp, *Salmonella* spp, *Shigella* spp, *Yersinia enterocolitica*, *Enterobacter* spp (Bryskier, 1999).

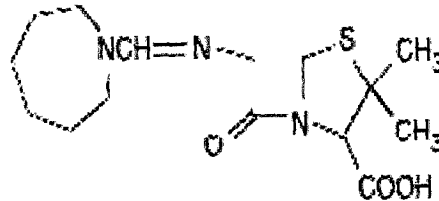
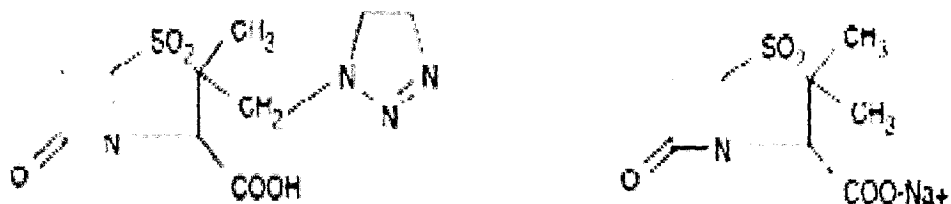


Figure 08: Structure chimique de la mécillinam (Cavallo *et al.*, 2004).

#### f) Pénicillines sulfones

Les principaux composés de ce sous-groupe sont le sulbactam et le tazobactam (figure 09). Bien qu'ayant une activité antibactérienne propre à de fortes concentrations, ce sont surtout des inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases par attachement et formation de complexes covalents irréversibles qui aboutissent à l'inactivation du site actif d'un grand nombre de  $\beta$ -lactamases appartenant essentiellement à la classe A d'Ambler. Ces deux produits sont très proches et présentent une sulfonation en position 1 sur le noyau pénème. Ils diffèrent essentiellement par une substitution de la chaîne latérale en Position 2 (Cavallo *et al.*, 2004).



Tazobactam

Sulbactam

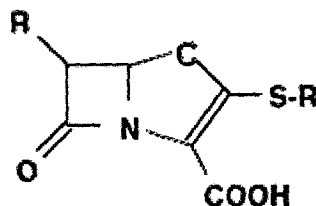
Figure 09 : Structure chimique des pénicillines sulfones (Nordmann *et al.*, 2012).

#### I.3.1.2. Pénèmes (carbapénèmes)

Les pénèmes sont caractérisés par la présence d'une double liaison dans le cycle pentagonal au noyau  $\beta$ -lactame, Ces produits possèdent un carbone à la place du soufre dans le cycle adjacent à l'anneau  $\beta$ -lactame (figure 10) (Duval and Soussy, 1990). Les carbapénèmes sont des  $\beta$ -lactamines qui présentent un très large spectre d'activité et une grande stabilité vis-à-vis de la plupart des  $\beta$ -lactamases. L'imipénème et le mérépénème ont été les deux premiers représentants disponibles en clinique. Depuis sept ans, une troisième molécule est disponible, l'ertapénème et

récemment le doripénème est venu s'ajouter aux autres carbapénèmes commercialisés (Cattoir and Daurel, 2010).

Le spectre anti-bactérien des carbapénèmes est pratiquement le même pour toutes les molécules à l'exception notable de l'ertapénème qui n'a qu'une activité marginale sur *P. aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii*. Toutes les molécules sont actives in vitro sur les bactéries Gram<sup>+</sup>, sauf sur les staphylocoques résistants à la méticilline et les entérocoques. Seul l'imipénème conserve une certaine activité vis-à-vis d'*Enterococcus faecalis*. Les entérobactéries sont très sensibles aux carbapénèmes (Wolff *et al.*, 2009).

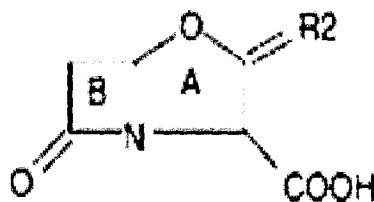


**Figure 10:** Structure chimique de la carbapénème (Nordmann *et al.*, 2012).

### I.3.1.3. Clavames (Oxapénames)

La structure chimique d'acide clavulanique a été identifiée par Howarth *et al.* (1976) (figure 11). Ce composé a été révélé un analogue de la structure de base de pénicilline. En molécule d'acide clavulanique, un atome d'oxygène remplace l'atome de soufre (Saudagar *et al.*, 2008).

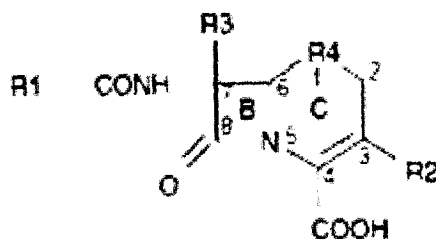
L'acide clavulanique produit par *Streptomyces clavuligerus*, ne possède qu'une faible activité antibactérienne mais il est capable d'inhiber la majorité des pénicillinases et des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BLSE), il n'inhibe par contre qu'un faible nombre de céphalosporinases, celles que produisent *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas cepacia* et *Bactéroïdes fragilis* (Duval and Soussy, 1990).



**Figure 11 :** Structure chimique de l'acide clavulanique (Nordmann *et al.*, 2012).

### I.3.2. Dérivés de l'acide 7-amino-céphalosporanique

Leur noyau de base associe un cycle  $\beta$ -lactame à un cycle dihydrothiazine pour former l'acide 7-aminocéphalosporanique ou 7-ACA (noyau céphème), qui distingue les céphalosporines des pénicillines. Suivant les substituants en R3 et R4, on distingue les céphalosporines, les céphamycines et les oxacéphèmes (Figure 12). La particularité du noyau céphème et les nombreux radicaux de substitution proposés expliquent les propriétés antibactériennes différentes des céphalosporines, justifiant leur distinction fonctionnelle en plusieurs générations, de spectre et d'intérêt clinique variables (Cavallo *et al.*, 2004).



**Figure 12:** Structure chimique de l'acide 7-amino-céphalosporanique (Cavallo *et al.*, 2004).

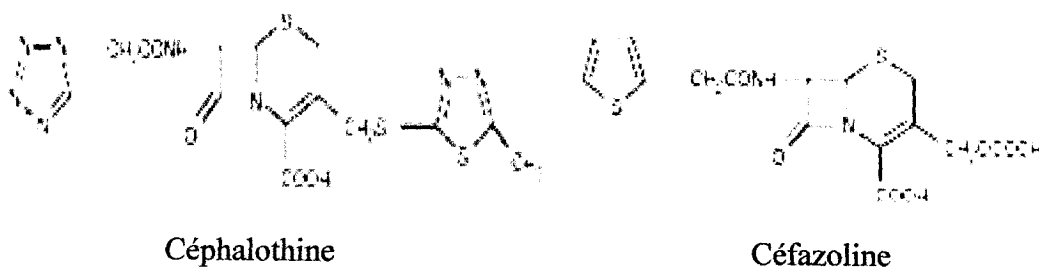
La croissance explosive des céphalosporines a encombré toutes les mémoires et rendu nécessaire un système de classification. Bien que les céphalosporines puissent être classées selon leur structure chimique, les données de pharmacologie clinique, leur résistance aux  $\beta$ -lactamases ou leur spectre antimicrobien on distingue, sur la base de leur spectre d'action, 4 générations de céphalosporines comportant divers antibiotiques (tableau I) (Goodman-Gilman, 1998 ; Cavallo *et al.*, 2004).

**Tableau I :** Exemples d'antibiotiques appartenant aux 4 générations de céphalosporines (Goodman-Gilman, 1998).

|                             |                                                                                              |
|-----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 <sup>ère</sup> génération | Céfadroxil, céfaloridine, céfalotine, céfapirinr, céfazoline, Céfradine, céfalexine          |
| 2 <sup>ème</sup> génération | Céfamandole, céfotiam, céfoxitine, céfuroxime, céfacor<br>Céfatrizine, céforanide, céfotétan |
| 3 <sup>ème</sup> génération | Céfotaxime, cefriaxone, ceftazidime                                                          |
| 4 <sup>ème</sup> génération | Céfépime, ceftiprome                                                                         |

### I.3.2.1. Céphalosporines de première génération (C1G)

La première génération des céphalosporines, dont les représentants sont la céfalotine et la céfazoline (figure 13), ont une bonne activité contre les bactéries Gram<sup>+</sup> et une activité relativement modérée contre les microorganismes Gram<sup>-</sup>. La plupart des cocci Gram<sup>+</sup> à l'exception des entérocoques, de *S. aureus* et de *S. epidermidis* méthicillino- résistants sont sensibles. La plupart des anaérobies des cavités orales sont sensibles, mais le groupe du *B. fragilis* est résistant. L'activité contre *Moraxella catarrhalis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, et *P. mirabilis* est bonne. Le spectre antimicrobien de la céfazoline est semblable à celui de la céfalotine. Bien que la céfazoline soit plus active contre des espèces d'*E. coli* et de *Klebsiella*, elle est légèrement plus sensible que la céfalotine à la  $\beta$ -lactamase staphylococcique (Goodman-Gilman, 1998).



**Figure 13 :** Structure chimique de céfalotine et céfazoline (Goodman-Gilman, 1998).

### I.3.2.2. Céphalosporines de deuxième génération (C2G)

Ce sont des molécules de structure variée, mais qui sont toutes caractérisées par une résistance à l'hydrolyse par les bactéries. Les représentants des C2G sont le céfuroxime et la céfoxitine. Les céphalosporines de la 2<sup>ème</sup> génération possèdent une activité contre les coques à Gram<sup>+</sup>. L'activité antibactérienne contre les bactéries à Gram<sup>-</sup>, notamment contre *Enterobacter* (Gaudy and Buxeraud, 2005).

#### - Céphalosporine $\alpha$ -alcoxyiminée : céfuroxime

En effet, la présence de la fonction oxime sur la chaîne latérale assure, d'une part, d'activité vis-à-vis des  $\beta$ -lactamases et d'autre part, déplace le spectre d'activité vers les germes à Gram<sup>-</sup>. Le céfuroxime est très semblable au céfamandole par sa structure chimique et son activité *in vitro*, bien qu'il soit légèrement plus résistant aux  $\beta$ -lactamases (Goodman-Gilman, 1998 ; Gaudy and Buxeraud, 2005).

#### - Céfoxitine

La céfoxitine est une céphamycine produite par *Streptomyces lactamdurans*. Elle est résistante à quelques  $\beta$ -lactamases produites par des bacilles Gram<sup>-</sup>. Cet antibiotique est plus actif que la céfalotine contre certains microorganismes Gram<sup>-</sup>. La céfoxitine est plus actif que d'autres dérivés de première et de seconde génération contre les anaérobies, particulièrement *B. fragilis*. La structure chimique de la céfoxitine est représentée dans la figure 14 (Goodman-Gilman, 1998).

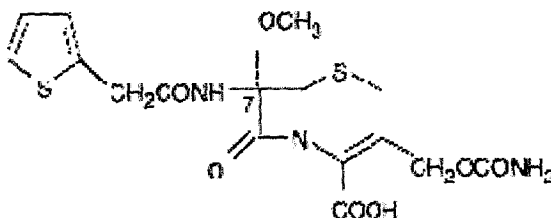


Figure 14 : Structure chimique de céfoxitine (Cavallo *et al.*, 2004).

### I.3.2.3. Céphalosporines de troisième génération

Les céphalosporines de troisième génération sont, « généralement », moins actives que les céphalosporines de première génération contre les coques à Gram<sup>+</sup>, mais sont beaucoup plus actives contre les entérobactéries (Essack, 2001).

#### \*Céfotaxime

Le céfotaxime a été le premier des céphalosporines de troisième génération à être disponible aux Etats-unis (figure 15). Ce médicament est fortement résistant aux plusieurs mais, pas à la totalité des  $\beta$ -lactamases et possède une bonne activité contre beaucoup de bactéries aérobies Gram<sup>+</sup> et Gram<sup>-</sup>. Cependant, son activité contre *B. fragilis* est faible comparée à celle de médicaments comme la clindamycine ou le métronidazole (Goodman-Gilman, 1998).

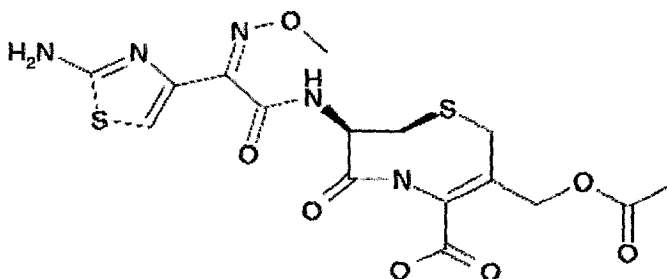


Figure 15 : Structure chimique de céfotaxime (Page, 2008).

### I.3.2.4. Céphalosporines de quatrième génération (C4G)

Les céphalosporines de quatrième génération céfpirome et céfépime (figure 16), présentent un spectre d'activité plus large que celui des céphalosporines de troisième génération. Leur activité spécifique repose sur la pénétration plus rapide à travers la membrane externe des bactéries Gram<sup>-</sup>, leur grande affinité pour les PLP, leur faible affinité pour les  $\beta$ -lactamases et leur stabilité vis-à-vis de certaines  $\beta$ -lactamases. Le céfpirome apparaît plus actif que le céfépime sur les bactéries Gram<sup>+</sup> (en particulier le pneumocoque) et moins actif sur les bactéries Gram<sup>-</sup>, surtout vis-à-vis *Pseudomonas aeruginosa* (Bingen, 1996).

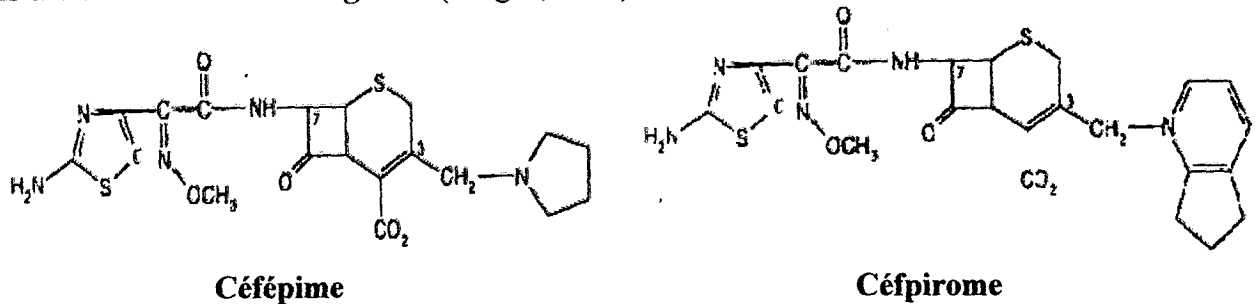


Figure 16 : Structure chimique de céfépime et céfpirome (Ferraro *et al.*, 1997).

### I.3.3. Monobactames

Les monobactames possèdent un noyau monocyclique  $\beta$ -lactame est rattaché un radical sulfoné (figure 17). Les monobactames sont des vrais antibiotiques à spectre sélectif : ils n'ont aucune activité sur les bacilles Gram<sup>+</sup> et les anaérobies (Birnbaum and vervloet, 1997 ; Mouton *et al.*, 2000). Leur activité est plus marquée vis-à vis des germes Gram<sup>-</sup> (*E. coli*, *Pseudomonas*). Parmi les molécules naturelles, seule la sulfazécine dont la structure comporte le tripeptide Gla-Ala-Ala (Brion, 1992).

Les premiers monobactames isolées sont des substances naturelles produites par certaines bactéries ; l'étude des relations structure activité a permis la mise au point de substances entièrement synthétique, dont la principale est l'aztréonam (Duval and Soussy, 1990). Aztreonam est un monobactame avec la même chaîne latérale acylaminée que le ceftazidime. Il a peu de propension vers la remise en ordre chimique et est donc commode pour vérifier si les mutations affectent seulement les interactions de chaîne latérale ou ont une influence plus large sur les voies s'embranchantes ouvertes de ceftazidime (Page, 2008).

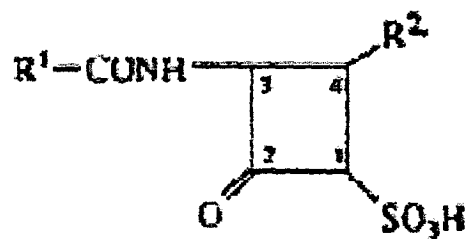


Figure 17 : Structure chimique de monobactame (Essack, 2001).

### I.4. Mode d'action de $\beta$ -lactamine

Les  $\beta$ -lactamines bloquent la synthèse du peptidoglycane (muréine), qui est le composé principal de la paroi des bactéries Gram<sup>-</sup> et Gram<sup>+</sup>, il s'agit d'un polymère formé de longues chaînes polyosidiques reliées entre elles par des ponts peptidiques (Gaudy and Buxeraud, 2005 ; Moulin and Coquerel, 2007).

### I.4.1. Paroi bactérienne

La paroi est une enveloppe rigide qui recouvre la membrane cytoplasmique et assure l'intégrité cellulaire et la forme de la bactérie (cocci, bacilles, vibrions) en la protégeant contre les forces osmotiques. Elle a également pour rôle de protéger la bactérie des agents extérieurs et d'assurer les échanges avec l'environnement. La structure de la paroi est différente selon qu'il s'agit de bactéries Gram<sup>+</sup> ou Gram<sup>-</sup>. Cependant, dans les deux cas, le peptidoglycane, substance spécifique des cellules bactériennes, en est un constituant majeur (Cavallo *et al.*, 2004).

La synthèse du peptidoglycane débute dans le cytoplasme de la bactérie, se poursuit dans la membrane cytoplasmique et se termine dans la paroi déjà formée. Un certain nombre d'enzymes interviennent dans la synthèse du peptidoglycane dont les plus importantes sont les transpeptidases, les transglycosylases et les carboxypeptidases (Gaudy and Buxeraud, 2005).

### I.4.2. Mécanisme d'action des $\beta$ -lactamines

Les  $\beta$ -lactamines se lient de façon covalente aux protéines enzymatiques qui catalysent les étapes finales de la synthèse du peptidoglycane, appelées protéines de liaison à la pénicilline (PLP) (figure 18). Les  $\beta$ -lactamines présentent une analogie structurale avec un constituant du peptidoglycane en formation, le dipeptide D-ala-D-ala qui est le substrat naturel de ces enzymes. Une fois le complexe PLP antibiotique créé, il devient physiologiquement inactif, ce qui a pour conséquence l'inhibition de la synthèse du peptidoglycane et l'arrêt de la croissance bactérienne. Cette situation entraîne habituellement la mise en jeu de mécanismes qui aboutissent à la mort bactérienne. Différents types de PLP ont été décrits chez les espèces bactériennes (PLP1a, PLP1b, PLP2, PLP3. . .) (Mimoz, 2001 ; Gaudy and Buxeraud, 2005).

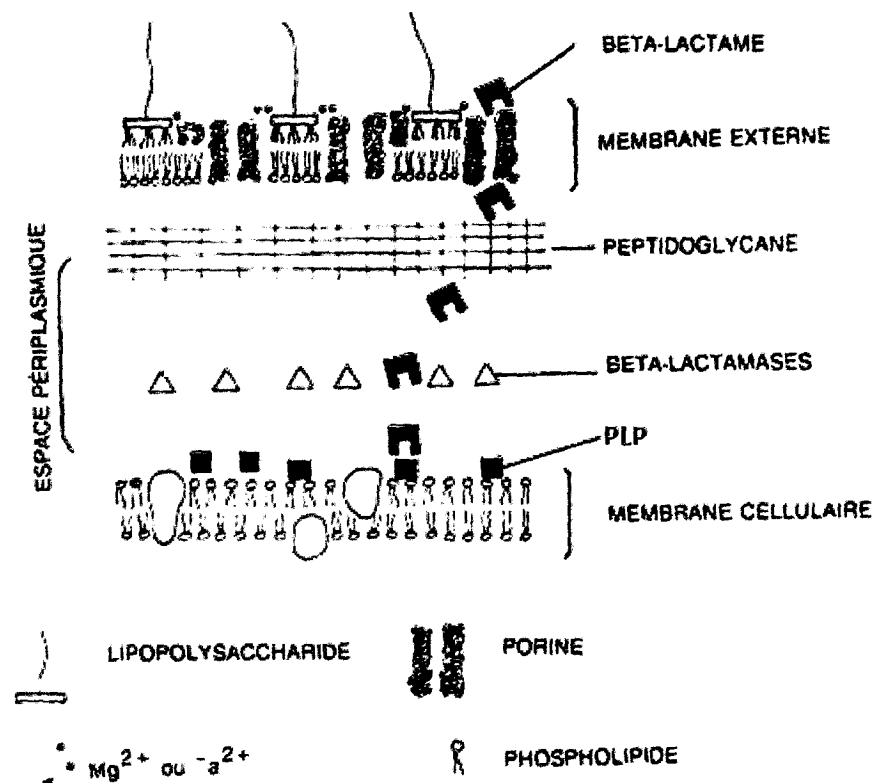


Figure 18 : Mécanisme d'action des  $\beta$ -lactamines (Brion, 1992).

Chez les bacilles Gram<sup>-</sup>, on retrouve entre six et huit PLP désignées d'un nombre en fonction de leur taille décroissante, ces PLP sont au nombre de sept pour les entérobactéries. Les quatre premières PLP (1a à 3) ont une activité transglycosylase/D-alanyl-D-alanine transpeptidase et jouent un rôle majeur dans la survie de la bactérie alors que les PLP4 à 6 ont une activité D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase et ne sont pas essentielles à la survie bactérienne (Cavallo *et al.*, 2004).

Chez les bactéries Gram<sup>+</sup> les molécules des  $\beta$ -lactamines traversent facilement les peptidoglycanes qui ne constituent pas une barrière pour aller se fixer sur les cibles (Gaudy and Bauxeraud, 2005).

Chaque  $\beta$ -lactamine a une affinité préférentielle différente vis-à-vis de chacune des PLP. Si on augmente la concentration de l'antibiotique, d'autres PLP moins affines sont également inhibées, donc l'action antibactérienne dépend de la molécule et de sa concentration. À titre d'exemple, des céphalosporines comme le céfotaxime ou la ceftazidime, qui ont une forte affinité pour la PLP3, vont l'inhiber à de faibles concentrations et provoquer une filamentation bactérienne, alors que, à de plus fortes concentrations, elles vont également inhiber les PLP1a et 1b, et provoquer l'apparition de sphéroplastés et une lyse rapide (Cavallo *et al.*, 2004).

## I.5. Utilisation des $\beta$ -lactamines

### I.5.1. Pénicillines

Les indications sont définies en fonction de la sensibilité du germe responsable. La benzylpénicilline demeure l'antibiotique de choix pour les infections à germes sensibles surtout localisées au niveau :

- de la sphère oto-rhino-laryngologique (ORL)
- des bronches
- des poumons (furoncles, anthrax, gangrènes) (Gaudy and Bauxeraud, 2005).

La pénicilline présente l'inconvénient de ne pas supporter l'acidité de l'estomac. Elle est donc inactive par voie orale, ce qui rend son utilisation peu pratique puisqu'elle nécessite une injection intramusculaire ou intraveineuse (Eberlin, 1994).

La phénoxyméthylpénicilline possède le même spectre que la benzylpénicilline est moins active. Elle est stable en milieu acide et peut être administrée par voie orale. Cependant, son absorption est variable et elle peut être utilisée que pour des organismes très sensibles, où une action rapide n'est pas recherchée (amygdalite à streptocoques). La phénoxyméthylpénicilline est utilisée dans le traitement prophylactique de la fièvre rhumatismale (Neal, 2003).

Pénicillines à large spectre, l'ampicilline et l'amoxicilline, sont actives contre les bactéries Gram<sup>+</sup> non productrices de  $\beta$ -lactamases. Comme elles diffusent plus facilement que la benzylpénicilline au travers de la membrane lipidique dans des bactéries Gram<sup>-</sup>. Elles sont, également actives contre de nombreuses souches d'*Escherichia coli*, d'*Haemophilus influenzae* et de *Salmonella*. Pour les administrations orales, l'amoxicilline constitue l'antibiotique de choix car elle est mieux absorbée que l'ampicilline qui devrait être administrée par voie parentérale. L'amoxicilline et l'ampicilline sont inactivées par les bactéries productrices de pénicillinases (Neal, 2003).