



**HAL**  
open science

# Bêta-lactamases des bactéries du genre *Prevotella* : étude du profil de substrat de l'enzyme

Nathalie Allart

► **To cite this version:**

Nathalie Allart. Bêta-lactamases des bactéries du genre *Prevotella* : étude du profil de substrat de l'enzyme. Sciences pharmaceutiques. 1996. dumas-01817641

**HAL Id: dumas-01817641**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01817641>**

Submitted on 18 Jun 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SID de Grenoble :  
[bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr](mailto:bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

<http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur>

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



D 115 017023 9

Université J.FOURIER-GRENOBLE I  
Faculté de pharmacie

1<sup>re</sup> exemplaire

Année 1996

THESE n° 7003

**Beta-lactamases des bactéries du  
genre *Prevotella* : étude du profil  
de substrat de l'enzyme.**

**MEMOIRE**

du Diplôme d'Etudes Spécialisées de Biologie Médicale,  
tenant lieu de thèse pour l'obtention du doctorat en pharmacie  
Présenté et soutenu publiquement le 8 février 1996.

par **Nathalie ALLART**

[Données à caractère personnel]

**JURY**

Président:	Madame	le Professeur	R.GRILLOT
Membres:	Monsieur	le Professeur	P.LE NOC
	Monsieur	le Professeur	A.PHILIPPON
	Monsieur	le Professeur	L.DUBREUIL
	Monsieur	le Docteur	J.CROIZE
	Monsieur	le Docteur	A.SEDALLIAN

Université J.FOURIER-GRENOBLE I  
Faculté de pharmacie

Mémoire n° 7003

**Beta-lactamases des bactéries du  
genre *Prevotella* : étude du profil  
de substrat de l'enzyme.**

**MEMOIRE**

du Diplôme d'Etudes Spécialisées de Biologie Médicale,  
tenant lieu de thèse pour l'obtention du doctorat en pharmacie  
Présenté et soutenu publiquement le 8 février 1996.

par **Nathalie ALLART**

[Données à caractère personnel]

**JURY**

Président:	Madame	le Professeur	R.GRILLOT
Membres:	Monsieur	le Professeur	P.LE NOC
	Monsieur	le Professeur	A.PHILIPPON
	Monsieur	le Professeur	L.DUBREUIL
	Monsieur	le Docteur	J.CROIZE
	Monsieur	le Docteur	A.SEDALLIAN

**Monsieur le Docteur A. SEDALLIAN**

Je tiens à vous exprimer ma profonde reconnaissance pour m'avoir accueillie dans votre service et m'avoir confié ce travail. Je vous remercie pour la grande disponibilité que vous m'avez toujours accordée et pour l'attention critique que vous avez portée à la rédaction de ce mémoire.

**Madame le Professeur R. GRILLOT**

Je vous remercie tout particulièrement d'avoir accepté de présider ce jury. Merci de votre intérêt et de votre disponibilité.

**Monsieur le Professeur P. LE NOC**

Je tiens à vous exprimer ma gratitude et mon respect. Vous m'avez initiée à la bactériologie, et vous avez su éveiller ma curiosité pour cette discipline. Je vous remercie également pour le généreux appui que vous m'avez apporté ainsi qu'à tous mes camarades internes en biologie, au titre de coordonateur du diplôme.

**Monsieur le Docteur J. CROIZE**

Je vous remercie de l'intérêt que vous avez porté à ce travail et d'avoir accepté de faire partie de ce jury.

**Monsieur le Professeur A. PHILIPPON**

Vous avez spontanément accepté de juger de la qualité de ce travail. Votre expérience des beta-lactamases rend très précieuse votre participation à ce jury. Veuillez trouver ici le témoignage de mes profonds remerciements.

**Monsieur le Docteur L. DUBREUIL**

Vous avez bien voulu témoigner de l'intérêt à ce travail en acceptant de faire partie de ce jury. Je vous en remercie très sincèrement.

Je tiens à remercier le **Dr Stéphane BLAND** pour son soutien, ses conseils et ses critiques.

Un grand merci à toute **l'équipe du Laboratoire de Bactériologie de l'Hôpital d'Annecy** pour sa gentillesse et ses encouragements.

Merci à Michèle DERONZIER, Nicole BAUQUIS, Catherine MOCELLIN qui m'ont fait profité de leur expérience des bactéries anaérobies.

Je remercie également les membres du Laboratoire de Virologie du Centre Hospitalier de Grenoble pour leur généreuse contribution à la préparation de mes extraits enzymatiques.

A mes parents

A ma famille

A mes amis grenoblois et annéciens

# Table des matières

---

## LEXIQUE

## INTRODUCTION p 1

## REVUE GENERALE p 3

### 1. TAXONOMIE ET IDENTIFICATION DES PREVOTELLA

- 1.1 Nouvelle nomenclature p 4
- 1.2 Caractères généraux p 5
- 1.3 Classification pratique p 6
- 1.4 Habitat et pouvoir pathogène p 7
- 1.5 Isolement, identification et antibiogramme p 9

### 2. IDENTIFICATION ET CLASSIFICATION DES BETA-LACTAMASES

- 2.1 Généralités p 11
- 2.2 Paramètres d'identification des beta-lactamases p 12
- 2.3 Méthodes de détection et de caractérisation des beta-lactamases p 13
- 2.4 Classification des beta-lactamases p 16

### 3. BETA-LACTAMASES ET ANAEROBIES

- 3.1 Beta-lactamases de *Fusobacterium nucleatum* p 20
- 3.2 Beta-lactamases des espèces du genre *Clostridium* p 20
- 3.3 Beta-lactamases des *Bacteroides* du groupe *fragilis* p 21
- 3.4 Beta-lactamases des *Prevotella* p 26
  - 3.4.1 fréquence des souches productrices p 26
  - 3.4.2 profil de substrat p 27

3.4.3	profil d'inhibition	p 27
3.4.4	point isoélectrique	p 27
3.4.5	masse moléculaire et localisation	p 28

	Conclusion	p 28
--	------------	------

4.	AUTRES MECANISMES DE RESISTANCE AUX BETA-LACTAMINES	p 31
----	-----------------------------------------------------	------

## **PARTIE EXPERIMENTALE**

### **MATERIEL ET METHODES**

#### 1. LES SOUCHES BACTERIENNES

1.1	Provenance et répartition	p 34
1.2	Identification et conservation	p 34

#### 2. CONDITIONS DE CULTURE

2.1	Anaérobiose	p 36
2.2	Température	p 36
2.3	Milieux de culture	p 36

#### 3. LES ANTIBIOTIQUES

#### 4. CONCENTRATIONS MINIMALES INHIBITRICES.

#### 5. CROISSANCE BACTERIENNE

#### 6. EXTRACTION DES BETA-LACTAMASES

#### 7. DOSAGE DES PROTEINES

#### 8. DETERMINATION SPECTROPHOTOMETRIQUE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE

#### 9. PRODUCTION DE BETA-LACTAMASE EN FONCTION DU TEMPS

10.	ETUDE D' INDUCTION	p 43
11.	PROFIL DE SUBSTRAT	
11.1	Choix des substrats antibiotiques	p 44
11.2	Choix des longueurs d'onde	p 44
11.3	Mesure des vitesses initiales	p 44
11.4	Détermination des constantes d'affinité $K_m$	p 44
11.5	Détermination des vitesses d'hydrolyse maximales $V_m$	p 45

## **RESULTATS**

1.	SENSIBILITE AUX BETA-LACTAMINES	p 49
2.	CROISSANCE BACTERIENNE	p 51
3.	PRODUCTION DE BETA-LACTAMASE EN FONCTION DU TEMPS	p 52
4.	ACTIVITE SPECIFIQUE ET CORRELATION AVEC LA SENSIBILITE AUX BETA-LACTAMINES	p 54
5.	POURCENTAGE D' ACTIVITE EXOCELLULAIRE	p 55
6.	EFFET INDUCTEUR	p 56
7.	PROFIL DE SUBSTRAT	p 56

<b>DISCUSSION</b>	p 61
-------------------	------

<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b>	p 67
-----------------------------------	------

<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	p 69
----------------------	------

## I-ABBREVIATIONS

AMP	ampicilline
BA	bronchoaspiration
CA	acide clavulanique
CAZ	céfazoline
CBT	cyto-bactériologie trachéale
CER	céfaloridine
CET	céfalotine
CFU	céfuroxime
CLOX	cloxacilline
CMI	concentrations minimales inhibitrices
CPG	chromatographie en phase gazeuse
CTX	céfotaxime
EDTA	acide éthylène diamine tétracétique
HPLC	chromatographie liquide haute performance
I	intermédiaire
IMP	imipénème
LBA	lavage bronchoalvéolaire
LCR	liquide céphalorachidien
FOX	céfoxitine
MOX	moxalactam
ORL	otorhinolaryngologie
PBS	tampon phosphate
pCMB	parachloromercuribenzoate de sodium
PEN	pénicilline G
PIP	pipéracilline
PLP	protéines de liaison aux pénicillines
PV	prélèvement vaginal
R	résistant
S	sensible
Sulb	sulbactam
TZB	tazobactam
UV	ultraviolet

## II-SYMBOLS CHIMIQUES

Co	cobalt
I	iode
Mn	manganèse
Zn	zinc

## III-GRANDEURS ET UNITES

da	daltons
$\epsilon$	coefficient d'extinction spécifique
g; $\mu$ g	grammes; microgrammes
g	unité d'accélération ( $1g = 9,81 \text{ cm} \cdot \text{sec}^{-2}$ )
Ki	constante d'inhibition (enzym.)
Km	constante de Michaëlis (enzym.)
$\lambda$	longueur d'onde
M; $\mu$ M	moles par litre; $\mu\text{mol/l}$
Mc Farland	étalon de néphélométrie
nm	nanomètres
pi	point isoélectrique
PM	masse moléculaire
rpm	rotations par minute
Vm	vitesse maximale d'hydrolyse (enzym.)
U	unités enzymatiques (1U= quantité d'enzyme hydrolysant 1 $\mu$ mole de nitrocéfine par minute et par mg.de protéines)
UFC	unité formant colonie (bacteriol.)

## IV- FIGURES ET TABLEAUX

- Figure 1: schéma pour l'isolement et l'identification des bactéries anaérobies (p 10)  
Figure 2: mesure de la croissance bactérienne chez une souche de *P. bivia* (p 39)  
Figure 3: modalités d'extraction des beta-lactamases (p 41)  
Figure 4: courbes d'hydrolyse de différents substrats par la souche 62 (p 46)  
Figure 5: traitement graphique des cinétiques obtenues pour la mesure des Km (p 47)  
Figure 6: courbe de croissance expérimentale chez une souche de *P. bivia* (p 51)  
Figure 7: production d'enzyme en fonction du temps chez une souche de *P. buccae* (p 53)  
Figure 8: production d'enzyme en fonction du temps chez une souche de *P. corporis* (p 53)  
Figure 9: période d'incubation optimale pour la production d'enzyme (p 52)

- Tableau I: caractères biochimiques des *Prevotella* (p 7)  
Tableau II: les différentes beta-lactamases décrites chez *B. fragilis* (p 23)  
Tableau III: phénotypes de résistance aux beta-lactamines chez *B. fragilis* (p 22)  
Tableau IV: beta-lactamase décrites chez les autres espèces de *Bacteroides* (p 25)  
Tableau V: fréquence des souches de *Prevotella* productrices de  $\beta$ -lactamase (p 26)  
Tableau VI: fréquence des souches productrices isolées à l'hôpital d'Annecy (p 26)  
Tableau VII: beta-lactamase décrites chez les *Prevotella* (p 29)  
Tableau VIII: caractères principaux des beta-lactamases des bactéries anaérobies (p 30)  
Tableau IX: les souches bactériennes testées pour leur sensibilité aux  $\beta$ -lactamines (p 35)  
Tableau X: concentrations minimales inhibitrices (p 50)  
Tableau XI: activité spécifique des extraits (p 54)  
Tableau XII: corrélation entre activité spécifique et CMI chez *P. bivia* et *P. oris* (p 54-55)  
Tableau XIII: Vm et Km des souches étudiées: valeurs expérimentales (p 57)  
Tableau XIV: Vm et ratios Vm/Km des souches étudiées: valeurs relatives (p 58)  
Tableau XV: les différentes classifications de beta-lactamases proposées (p 19 bis)

Annexe 1: Valeurs de Vm, Km et ratios Vm/Km vis-à-vis des céphalosporines:  
valeurs brutes valeurs relatives par rapport à la céfalotine.  
D'après Appelbaum (5).(p 59-60).

Annexe 2: Dendrogramme illustrant les analogies structurales des beta-lactamases  
D'après Bush, Jacoby et Medeiros (22 bis).(p 19 ter)

# **INTRODUCTION**

# Introduction

---

Les bactéries anaérobies strictes présentent les mêmes mécanismes de résistance que ceux observés chez les bactéries aérobies. La production d'une enzyme hydrolysant le cycle beta-lactame représente l'un de ces mécanismes. L'importance des anaérobies en pathologie humaine et la prévalence des souches productrices de beta-lactamase justifie l'intérêt qui est porté à ces enzymes depuis plusieurs années.

Notre travail porte sur l'étude de la beta-lactamase produite par un ensemble d'espèces de bactéries anaérobies strictes classées dans le genre *Prevotella*. Ces germes autrefois classés dans le genre *Bacteroides* / groupe *oralis-melaninogenicus*, font partie de la flore commensale associée aux cavités buccale et génitale de l'homme; ils sont actuellement reconnus comme des agents opportunistes responsables d'une grande variété d'infections telles que: infections de la sphère ORL, infections respiratoires basses, pleurésies, infections des tissus mous, infections urogénitales.

La recherche d'une activité beta-lactamase chez des souches de *Prevotella* a fait l'objet de précédents travaux réalisés dans le laboratoire du centre hospitalier d'Annecy (57, 84, 109). Le but de notre travail est d'apporter une contribution à la caractérisation de l'enzyme par l'évaluation du profil de substrat.

La première partie de ce mémoire est une revue générale sur:

- les critères de classification et d'identification des espèces du genre *Prevotella*.;
- les paramètres d'identification et les techniques d'étude des beta-lactamases;
- les connaissances actuelles sur les beta-lactamases des bactéries anaérobies en général, et des *Prevotella* en particulier.

La deuxième partie décrit nos travaux personnels, en particulier la mesure spectrophotométrique des constantes cinétiques  $K_m$  et  $V_m$  vis-à-vis d'une gamme de substrats chez une dizaine de souches.

**REVUE**  
**GENERALE**

# 1- TAXONOMIE ET IDENTIFICATION DES PREVOTELLA

## 1.1. Nouvelle nomenclature:

La famille des *Bacteroidaceae* comprend les bacilles à Gram négatif, anaérobies strictes, non sporulés, immobiles ou mobiles par une ciliature péritriche (11). Cette famille comprenait 13 genres dans l'édition de 1984 du Bergey's Manual of Bacteriology. Depuis, le genre *Bacteroides* qui renfermait des espèces phénotypiquement très différentes a été remanié et de nouveaux genres ont été créés:

-le genre *Prevotella* a ainsi été créé en 1990 (85) pour les anciens *Bacteroides* du groupe *oralis-melaninogenicus* .

-les espèces pigmentées en noir mais assaccharolytiques telles que *B.assacharolyticus*, *B.salivosus* , *B. endodontalis* , *B. gingivalis* ont été reclassées dans le genre *Porphyromonas* .

-les autres espèces n'appartenant pas au groupe *fragilis* ont également été replacées dans d'autres genres: *Anararhabdus* , *Fibrobacter* , *Megamonas* etc..., ou sont actuellement en attente de classification (ex: *B. gracilis* , *B.capillosus* ). Toutes les espèces non apparentées à *Bacteroides fragilis* sont destinées à terme à être reclassées dans d'autres genres existants ou à créer ; le genre *Bacteroides* devrait alors être réduit à l'actuel groupe *fragilis* (87) qui comprend les espèces suivantes:

### Groupe *fragilis*

*B.caccae*

*B.distasonis*

*B.eggerthii*

*B.fragilis*

*B.merdae*

*B.ovatus*

*B.stercoris*

*B.thetaiotaomicron*

*B.uniformis*

*B.vulgatus*.

Nous adoptons ici la nouvelle nomenclature remise à jour en 1993 et 1995 (92):

<u>Nouvelle nomenclature</u>	<u>Ancienne nomenclature</u>
<i>P.bivia</i>	<i>B.bivius</i>
<i>P.buccae</i>	<i>B.buccae</i>
<i>P.buccalis</i>	<i>B.buccalis</i>
<i>P.corporis</i>	<i>B.corporis</i>
<i>P.dentalis</i>	<i>Mitsukella dentalis</i>
<i>P.denticolae</i>	<i>B.denticolae</i>
<i>P.disiens</i>	<i>B.disiens</i>
<i>P.enoeca</i>	
<i>P.heparinolytica</i>	<i>B.heparinolyticus</i>
<i>P.intermedia</i>	<i>B.intermedius</i>
<i>P.levii</i>	<i>B.levii</i>
<i>P.loeschii</i>	<i>B.loeschii</i>
<i>P.macaccae</i>	<i>B.macaccae</i>
<i>P.melaninogenica</i>	<i>B.melaninogenicus</i>
<i>P.nigrescens</i>	
<i>P.oralis</i>	<i>B.oralis</i>
<i>P.oris</i>	<i>B.oris</i>
<i>P.oulorum</i>	<i>B.oulorum</i>
<i>P.ruminicola</i>	<i>B.ruminicola</i>
<i>P.tannerae</i>	
<i>P.veroralis</i>	<i>B.veroralis</i>
<i>P.zoogleoformans</i>	<i>B.zoogleoformans</i>

## 1.2. Caractères généraux:

Les bactéries du genre *Prevotella* sont des petits bacilles Gram négatif. Leurs caractères cultureux sont:

- anaérobiose obligatoire
- exigence en hémine
- croissance lente (48 à 72 h)
- température optimale: 35-37°C
- pigmentation en noir des colonies sur gélose au sang: variable selon les souches.

Elles sont résistantes à la kanamycine, sensibles au vert brillant et à la bile. Ce dernier caractère les distingue en routine du genre *Bacteroides*.

Leur pouvoir saccharolytique est modéré. Les principaux produits de fermentation sont l'acide acétique et l'acide succinique.

Leur ratio moléculaire Guanosine /Cytosine se situe entre 40 et 50 %.

Leur peptidoglycane pariétal contient un acide particulier: l'acide méso-diaminopimélique; la composition en acides gras du lipopolysaccharide est marquée par la prédominance en acides de type antéiso-C15 (12',82,85).

### 1.3. Classification en groupes:

Les espèces du genre *Prevotella* peuvent être scindées en plusieurs groupes selon (85):

- leurs propriétés biochimiques
- la présence ou l'absence de pigmentation
- leur habitat et rôle pathogène.

On peut ainsi distinguer les groupes suivants:

-le groupe I (*P.oris* ; *P.buccae* ; *P.heparinolytica*; ; *P.dentalis* ) rassemble les espèces isolées de l'appareil respiratoire, fermentant les pentoses (xylose, arabinose) et ne pigmentant pas sur gélose au sang après 10 jours d'incubation en anaérobiose.

-le groupe II (*P.oralis* ; *P.veroralis* ; *P.buccalis* ; *P.oulora* ) rassemble les espèces isolées également de l'appareil respiratoire, ne fermentant pas les pentoses, mais fermentant le saccharose.

-le groupe III (*P.melaninogenica* ; *P.loeschii* ; *P.denticolae* ; *P.intermedia* ; *P.corporis* ) rassemble des espèces dont les colonies sont pigmentées en noir, qui ne fermentent pas les pentoses mais fermentent le saccharose, et résistent à la vancomycine. *P.denticolae* et *P.loeschii* sont isolées dans les infections de la cavité buccopharyngée; les autres sont isolées à la fois des suppurations abdominales, gynécologiques, et respiratoires.

-le groupe IV (*P.bivia* ; *P.disiens* ) rassemble les espèces isolées d'infections urogénitales et appartenant à la flore vaginale. Elles ne fermentent ni les pentoses ni le saccharose, et leurs colonies ne sont pas pigmentées en noir. *P.enoeca* et *P.tanneriae* sont des espèces récemment décrites; elles sont isolées dans les maladies du périodonte et ont des caractères proches de ceux des espèces du groupe IV.

Le tableau I résume les principaux caractères biochimiques des espèces du genre.



#### 1.4. Habitat et pouvoir pathogène:

Les bactéries Gram négatif anaérobies strictes font partie de la flore normale de la cavité buccale, du tractus intestinal, et du vagin.

Dans la bouche on isole *P.oris*, *P.buccae*, *P.denticolae*, *P.loeschii*, *P.oralis*, *P.intermedia* à côté de *Porphyromonas gingivalis* et *P.endodontalis*. Les *Bacteroides* du groupe *fragilis* sont prépondérants dans le tractus intestinal en association avec *C.difficile* et le *Bifidobacterium*. Dans la flore vaginale, à côté de la flore de Döderlein constituée de *Lactobacillus* et de *Bifidobacterium*, on retrouve *P.bivia*, *P.disiens* et *Porphyromonas assacharolytica* impliqués dans les vaginoses bactériennes.

La plupart de ces bactéries sont responsables d'infections mixtes opportunistes associant des bactéries aérobies à des bactéries anaérobies strictes ou facultatives. Les suppurations se développent au voisinage de la flore normale, à l'occasion d'un traumatisme, d'une intervention chirurgicale, d'une nécrose. La notion de terrain est également importante: des facteurs tels que diabète, immunodépression, éthyliste sont favorisants.

Les *Prevotella* commensales de la bouche peuvent entraîner des infections stomatologiques, en particulier chez les sujets dont l'hygiène buccodentaire est déficiente: gingivite, parodontite, abcès dentaires, ainsi que des infections respiratoires: sinusites, pneumopathies ou pleurésies d'aspiration.

Les bactéries de la flore intestinale (*B. fragilis* essentiellement) sont responsables de péritonites et d'abcès péritonéaux. *P.melaninogenica* et *P.corporis* peuvent être plus rarement isolés dans ce type d'infection.

Les bactéries de la flore vaginale sont responsables de salpingites, chorioamniotites, endométrites, et participent également à la vaginose bactérienne. Cette entité ne résulte pas d'une réelle infection mais d'un déséquilibre de la flore locale entraînant une modification du pH (remplacement de la flore de Döderlein par un ensemble de bactéries comprenant *Prevotella bivia* et *P.disiens*, *Mobiluncus*, *Gardnerella vaginalis*, *Fusobacterium* ).

### **1.5. Isolement, identification et antibiogramme:**

La recherche de bactéries anaérobies est orientée par la nature du prélèvement d'une part (anaérobies à rechercher dans les plaies, abcès, hémocultures, liquides de ponction), et par l'aspect du pus d'autre part: abondant, d'odeur fétide; peu de polynucléaires à l'examen direct, et nombreuses bactéries Gram positif et négatif de toutes formes.

La conduite pratique de l'isolement et de l'identification peut répondre au schéma de la figure 1 (82).

L'identification repose sur un ensemble de tests:

-des test d'orientation: coloration de Gram, mobilité à l'état frais, sensibilité à la bile (5  $\mu$ g) et au vert brillant (10  $\mu$ g) (Anaerodics° BIOMERIEUX)

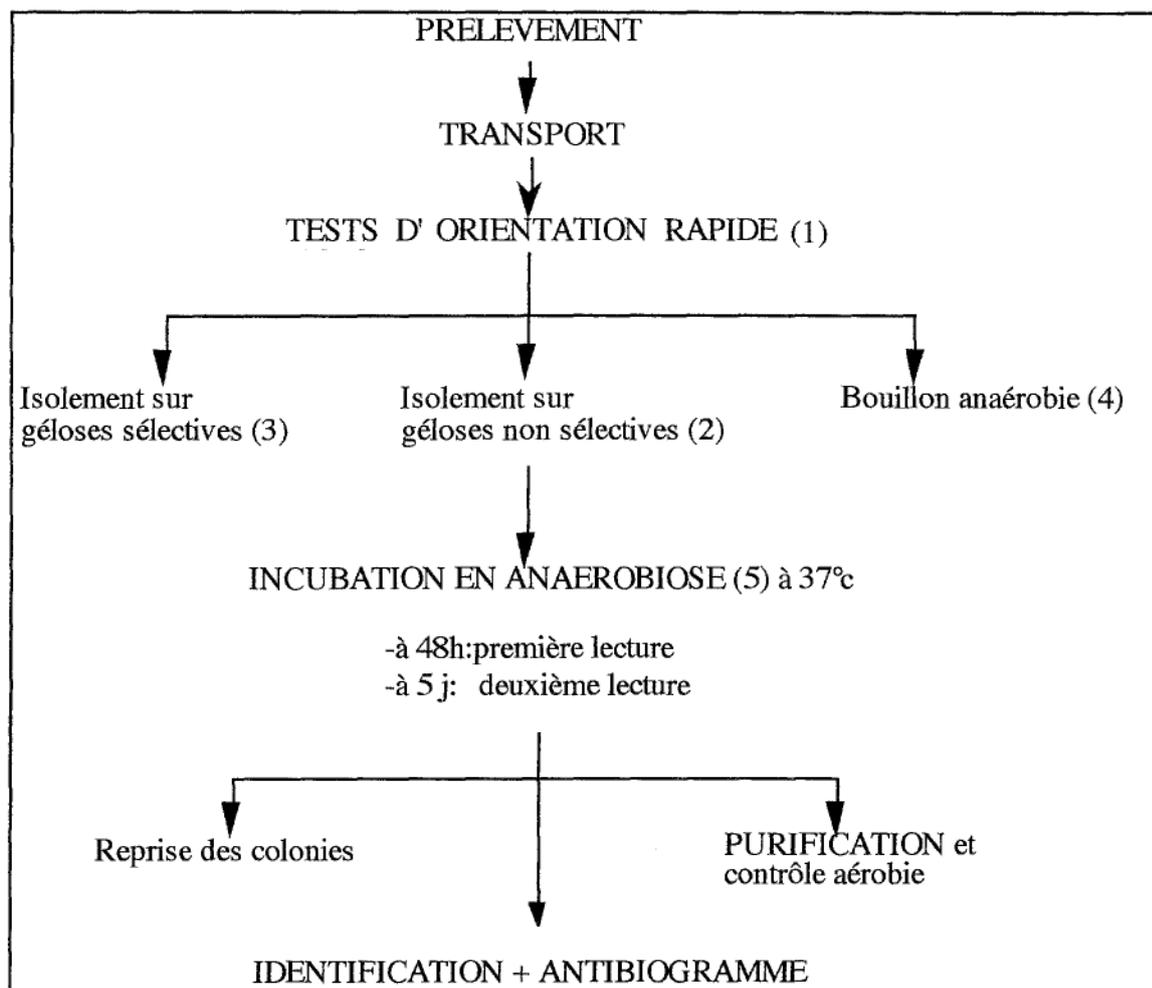
-des test d'identification:

- la recherche de la fermentation des sucres par la galerie Api 20 ANA°
- la recherche des activités enzymatiques par la galerie Rapid ANA°
- l'analyse des extraits étherés et méthylés en chromatographie phase gazeuse.

L'antibiogramme standard doit comprendre la recherche de sensibilité aux antibiotiques suivants: kanamycine, vancomycine, métronidazole, pénicilline, colistine, érythromycine, rifampicine, pristinamycine.

En pratique, l'isolement et l'identification des souches exigent un délai de 1 à 3 semaines. De ce fait, le traitement antibiotique précède souvent les résultats de l'antibiogramme. Le choix de l'antibiothérapie doit tenir compte de la fréquence des pathogènes isolés en fonction des sites infectieux et des profils de sensibilité habituels aux antibiotiques.

fig1: Schéma pour l'isolement et l'identification des bactéries anaérobies



- (1)-Aspect du pus-Examen direct à la coloration de Gram  
 (2)-bases gélosées:Schaedler au sang, ou Columbia au sang enrichie en hémine et vitamine K.  
 (3)-mêmes milieux additionnés d'un mélange antibiotique: kanamycine+vancomycine, ou néomycine+ vancomycine.  
 (4)-Rosenow-Schaedler-TGY (subcultures pour analyse chromatographique)  
 (5)-atmosphère anaérobie réalisée en jarre avec des sachets libérant H<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub> et un catalyseur, ou en chambre anaérobie avec un mélange gazeux (N<sub>2</sub>+H<sub>2</sub>+CO<sub>2</sub>).

## 2- IDENTIFICATION ET CLASSIFICATION DES BETA-LACTAMASES

### 2.1. Généralités:

Les beta-lactamases sont des enzymes capables d'hydrolyser la liaison amide du cycle beta-lactame, entraînant ainsi la formation de dérivés dépourvus d'activité antibactérienne. Ces enzymes sont synthétisées par de nombreux organismes vivants, parmi lesquels se trouvent de nombreuses espèces de bactéries anaérobies.

Les paramètres de l'hydrolyse enzymatique ( $K_m$  et  $V_{max}$ ) peuvent être mesurés ou calculés par les techniques usuelles de cinétique enzymatique et l'équation de Michaelis-Menten:  $V_i = V_m(S) / (K_m + (S))$

L'activité des beta-lactamases peut être inhibée par différents inhibiteurs et selon plusieurs schémas:

-inhibition non covalente (mode d'action de la céfoxitine dont l'hydrolyse est extrêmement lente). Cette inhibition peut être réversible ou non.

-inhibition irréversible covalente selon trois possibilités:

-modification du site actif de l'enzyme (mode d'action du paramercuribenzoate ou pCMB)

-fixation covalente à l'enzyme en un site différent du site actif (inhibition du type marqueur d'affinité)

-"inhibition suicide": l'inhibiteur se lie de façon non covalente au site actif, puis est hydrolysé. Le produit d'hydrolyse se fixe de façon covalente et rend le processus irréversible (mode d'action du sulbactam et de l'acide clavulanique) (18).

## 2.2. Paramètres d'identification des beta-lactamases:

A l'heure actuelle, en l'absence de données moléculaires suffisantes, les classifications usuelles des beta-lactamases (21,22,74,95,96) reposent sur des critères biochimiques tels que profil de substrat et profil d'inhibition, et sur des critères physicochimiques tels que la masse moléculaire et le point isoélectrique. Le support génétique, chromosomique ou plasmidique, est un autre paramètre important.

D'après Bush (21,22) et Sykes (19), la caractérisation d'une nouvelle beta-lactamase doit faire appel aux paramètres suivants:

- profil de substrat exprimé en terme de  $V_{max}$  et  $K_m$ . La valeur du ratio  $V_{max}/K_m$  serait la mieux à même de traduire l'hydrolyse physiologique (19,20, 26 bis)\*.
- profil d'inhibition
- étude d'induction

Pour ce faire, ces auteurs ont formulé un certain nombre de recommandations parmi lesquelles nous retenons:

(1)-L'isoélectrofocalisation est un prérequis qui permet de s'assurer de la présence d'une seule enzyme dans la préparation (une seule bande majeure en électrophorèse sur gel de polyacrylamide).

(2)-Il est souhaitable de travailler sur des fractions enzymatiques purifiées, et il est indispensable de mentionner l'activité spécifique si l'on travaille sur des préparations non ou partiellement purifiées. L'activité spécifique est exprimée en U/mg de protéines. 1 unité de beta-lactamase est la quantité d'enzyme qui catalyse la transformation d'1  $\mu$ mole par minute, ceci pour un substrat de référence et dans des conditions de pH et température données.

(3)-La concentration en substrat ne doit pas être trop élevée car dans ce cas, un effet inhibiteur est possible. Aussi, il est recommandé d'utiliser des gammes de concentration en substrat de l'ordre de 100  $\mu$ g/ml. Pour ce faire, la méthode spectrophotométrique, plus sensible, est mieux adaptée que les méthodes acidimétrique et iodométrique.

(4)-Les mesures doivent être réalisées en continu plutôt qu'en point final. De cette façon, les déterminations de la vitesse initiale  $V_i$  sont plus fiables. Il est également recommandé d'effectuer les mesures en double.

(5)-Les antibiotiques évalués pour leur effet inhibiteur doivent être étudiés sans et avec préincubation (enzyme + inhibiteur). Les ratios substrat / inhibiteur doivent être mentionnés et les résultats exprimés en terme de valeurs de  $K_i$ .

\* On trouve les résultats exprimés sous cette forme dans les publications les plus récentes.

## **2.3. Méthodes de détection et de caractérisation des beta-lactamases:**

### **2.31.Détection:**

Il est possible de détecter une activité de type beta-lactamase au moyen d'une céphalosporine chromogène dont l'hydrolyse forme un produit coloré: nitrocéphine (OXOID) ou Padac (BEHRING). Cette méthode rapide est utilisable en milieu liquide (59) ou sur papier: diques Céfinase° (OXOID) (13,35). Elle est applicable aux colonies bactériennes, surnageants ou filtrats de culture, et extraits enzymatiques après éclatement des corps bactériens.

### **2.32.Extraction et purification:**

#### **Préparation de l'extrait brut:**

La méthode principale est la sonication suivie de centrifugation à froid. L'extrait enzymatique est récupéré dans le surnageant.

L'éclatement des corps bactériens peut être réalisé également par d'autres techniques:

- choc osmotique

- congélation-écrasement (32).

#### **Purification:**

L'extrait brut acellulaire peut nécessiter une purification pour séparer l'enzyme des autres protéines bactériennes solubles. Cette purification associe en général plusieurs étapes; les premières étapes font appel à des techniques simples telles que dialyse (40), précipitation par le sulfate d'ammonium (24), ultrafiltration ; les étapes suivantes font appel à des techniques plus fines telles que chromatographie d'échange d'ions, chromatographie d'exclusion-diffusion (gel filtration).

Certains auteurs (34,51,68) ont décrit une procédure de purification en une seule étape par chromatographie d'affinité (utilisation d'un résidu cloxacilline ou ampicilline couplé au gel de sépharose).

Le degré de purification peut être apprécié par la mesure de l'activité catalytique rapportée au taux de protéines: c'est l'activité spécifique. Le taux de protéines est mesuré le plus généralement par la technique de Lowry (53), ou évalué par l'absorbance de la préparation à 280 nm. Une autre technique sensible est la technique de Bradford qui utilise le bleu de Coomassie (14).

### 2.33. Caratérisation:

#### Mesure de l'activité catalytique et détermination du profil de substrat:

La beta-lactamase est testée vis-à-vis de plusieurs beta-lactamines. L'hydrolyse de ces beta-lactamines est mesurée par différentes méthodes:

#### -spectrophométrie dans l'UV et le visible:

Les valeurs  $K_m$  et  $V_i$  peuvent être déterminées par une mesure spectrophotométrique directe (66,77,103), en suivant les variations de densité optique en fonction du temps. La loi de Beer-Lambert permet d'écrire:  $\Delta(A) = (\epsilon_p - \epsilon_s).l.\Delta(P)$ .

$\Delta(\epsilon) = \epsilon_p - \epsilon_s$  est le coefficient d'absorption moléculaire différentiel. Les longueurs d'onde spécifiques des beta-lactamines pour lesquelles ce coefficient est maximal sont:

benzylpénicilline	232 nm	céfoxitine	261 nm (ou 270 nm)
ampicilline	235 nm	céfotaxime	264 nm
céfaloridine	255 nm	moxalactam	275 nm
céfalotine	265 nm	imipénème	297 nm
céfuroxime	264 nm	nitrocéphine	482 nm

Il est également possible de déterminer indirectement les valeurs de  $K_m$  par interaction compétitive entre la beta-lactamine et la nitrocéfine (1,40,48,94): la vitesse d'hydrolyse initiale de la nitrocéfine à différentes concentrations est mesurée en présence d'une quantité définie de beta-lactamase sous un volume fixe. Chaque concentration de nitrocéphine est combinée avec 5 concentrations de beta-lactamine. Les valeurs apparentes de  $K_m$  pour la nitrocéphine sont reportées contre la concentration en antibiotique pour obtenir graphiquement la valeur de  $K_m$  pour l'antibiotique (94). Cette méthode est recommandée lorsque des gammes importantes de concentration en antibiotique sont investiguées (40). Elle peut également être réalisée en microplaques (41).

#### -chromatographie phase liquide sous haute pression :

Le substrat ou le produit de dégradation peut être dosé par HPLC (23,98).

#### -microacidimétrie:

Le produit d'hydrolyse est un acide (pénicilloïque ou céphalosporique) dosable par pHmétrie. (42,47,71)

#### -méthode microiodométrique:

La réduction de l'iode provoque la décoloration du milieu (65,70,94). Cette méthode convient mal aux beta-lactamases des *Bacteroides* qui sont inhibées par l'iode.

#### -méthode microbiologique:

L'extrait acellulaire est ajouté à une solution de beta-lactamine, puis déposée au contact d'une souche test sensible à cette beta-lactamine. La croissance de la bactérie-test indique la dégradation de la beta-lactamine par l'extrait bactérien. Le diamètre de la zone d'inhibition permet d'évaluer indirectement le degré de l'hydrolyse (dégradation totale ou

partielle). Cette technique intéressante a déjà été mise à profit au laboratoire (56,57); elle permet également d'avoir une approche du profil de substrat.

Les méthodes spectrophotométrique, microacidimétrique, et chromatographique permettent de déterminer les constantes  $K_m$  et  $V_m$  en faisant varier les concentrations en substrat. La technique spectrophotométrique offre l'avantage de sa simplicité: elle ne nécessite pas un matériel onéreux comme c'est le cas pour la technique microacidimétrique.

#### **Profil d'inhibition:**

L'inhibition de l'activité enzymatique est estimée après préincubation de l'inhibiteur ajouté à l'enzyme. L'activité enzymatique résiduelle est mesurée vis à vis du substrat de référence: nitrocéphine ou céfaloridine par les méthodes précitées.

#### **Etude d'induction:**

L'effet inducteur d'un produit est recherché par addition du produit au milieu de culture (liquide) à la phase présumée de croissance exponentielle. Les principaux antibiotiques connus pour leurs propriétés inductrices sont la céfoxitine, la pénicilline.

#### **Détermination de la masse moléculaire:**

La méthode principale est l'électrophorèse en gel de polyacrylamide, après dénaturation par le sodium dodécyl sulfate (SDS-PAGE) avec dépôt de marqueurs de poids moléculaire.

Une autre technique possible est la gelfiltration sur résine calibrée avec des marqueurs de poids moléculaire.

#### **Détermination du point isoélectrique:**

Le point isoélectrique est le pH pour lequel les composés de nature polypeptidique ont leurs charges électriques équilibrées. Ce  $p_i$  est repéré par électrophorèse dans un gel d'acrylamide contenant des ampholines qui réalisent un gradient de pH (technique d'isoélectrofocalisation). Après l'électrophorèse, les bandes présentant une activité beta-lactamase sont révélées par une céphalosporine chromogène (nitrocéphine) (60).

## 2.4 Classification des beta-lactamases:

### 2.4.1 Différentes classes de beta-lactamases:

Il existe deux grands types de classification:

(1)-Les rapprochements basés sur l'activité enzymatique constituent un abord pratique dans la mesure où ils mettent directement en évidence les implications thérapeutiques. Dans ce domaine, la classification proposée par Bush (21,22,22bis) présente l'intérêt d'être récente et de rassembler presque toutes les enzymes décrites jusqu'à parution, y compris des  $\beta$ -lactamases décrites chez des espèces anaérobies. Il est intéressant de la confronter aux travaux de Richmond et Sykes (74) qui constituent une sorte de référence dans le classement des  $\beta$ -lactamases chez les bactéries Gram négatif.

(2)-Le classement basé sur des données structurales est plus théorique en première analyse mais il permet d'aborder le mécanisme des relations enzyme-substrat à l'échelle moléculaire et il pourrait permettre dans l'avenir de préciser la phylogénèse de ces enzymes. Les travaux d'Ambler (3) ont été les premiers à privilégier ces critères de structure. D'autres travaux faisant suite à sa première étude (Jaurin et Grunstrom 1981; Huovinen et Jacoby 1988) ont permis de considérer 4 classes distinctes A, B, C et D. La classe A regroupe les pénicillinases des bactéries Gram positif possédant un résidu sérine au sein du site actif; la classe B regroupe des métallo-enzymes; la classe C regroupe les sérine-céphalosporinases chromosomiques, des bacilles Gram négatif essentiellement; la classe D regroupe des sérine- $\beta$ -lactamases hydrolysant l'oxacilline (oxacillinases). Malgré tout, le nombre de  $\beta$ -lactamases pour lesquelles des informations structurales sont connues reste relativement limité.

## 2.4.2 Classification de Bush:

Nous adoptons ici la classification récente de Bush (21,22) qui est adaptée aux bactéries aérobies comme aux bactéries anaérobies:

**Groupe 1 (CEP-N):** Il est corrélé aux classes Ia, Ib et Id de Richmond, Sykes et Matthew (74,95) et rassemble des enzymes qui partagent les propriétés suivantes:

- enzymes chromosomiques (ex: amp C codée par un gène chromosomique amp C)
- souvent inductibles; possibilité de dérepression
- hydrolyse plus rapide de la céphaloridine et de la céfalotine que des pénicillines ("céphalosporinases")
- peu ou pas inhibées par l'acide clavulanique et le sulbactam, mais inhibées par la cloxacilline et l'aztreonam
- pi basique
- PM > 30.000 en g<sup>al</sup>
- sur un plan moléculaire, toutes les enzymes de ce groupe qui ont été étudiées sont incluses dans la classe C d'Ambler (3).

**Groupe 2:** Il inclut une variété d'enzymes qui sont toutes inhibées par l'acide clavulanique.

### **Groupe 2a (PEN-Y)**

Il inclut les pénicillinases classiques des bactéries Gram+ pour la plupart (ex: PC1 de *Staphylococcus aureus* ).

- ces enzymes hydrolysent plus rapidement les pénicillines que les céphalosporines
- elles sont inhibées par l'acide clavulanique et le sulbactam mais pas par la cloxacilline
- d'origine plasmidique ou chromosomique
- exocellulaires le plus souvent.
- un grand nombre de ces enzymes appartiennent à la classe moléculaire A d'Ambler (le site actif contient un résidu sérine).

### **Groupe 2b (BDS-Y)**

Il inclut des beta-lactamases à large spectre hydrolysant à la fois les pénicillines et les céphalosporines, et inhibées par l'acide clavulanique. Leurs propriétés sont:

- origine plasmidique en général (ex. les plus connus: TEM-1 et -2, SHV-1, ROB-1...)
- meilleure inhibition par l'acide clavulanique que par la cloxacilline ou l'aztreonam
- PM < 30.000 en général
- faible hydrolyse des céphalosporines à spectre étendu (3<sup>ème</sup> génération)
- parmi ce groupe se trouvent plusieurs  $\beta$ -lactamases de la classe moléculaire A.

### **Groupe 2be (EBS-Y)**

Il inclut des beta-lactamases à spectre étendu, et inhibées par l'acide clavulanique (ex: CTX-1, CAZ-1, SHV-2 et -3). Leurs propriétés sont:

- capacité d'hydrolyser les  $\beta$ -lactamines aminothiazolaximes ou les  $\beta$ -lactamines à spectre large (carboxy- et uréidopénicillines, céphalosporines de 2 et 3<sup>ème</sup> génération); les céphamycines (céfoxitine, céfotétan, latamoxef) et l'imipénème ne sont pas hydrolysés.
- origine plasmidique engénéral.
- origine chromosomique pour K1 (*K. aerogenes*, *K. oxytoca*) incluse dans ce groupe car capable d'hydrolyser l'aztreonam.
- bonne inhibition par l'acide clavulanique, le sulbactam, l'aztreonam.

Ces beta-lactamases dérivent de celles du groupe 2b par mutation.

### **Groupe 2br**

Ce groupe nouveau renferme des  $\beta$ -lactamases dérivées également du groupe 2b par mutation et qui présentent une affinité réduite pour l'acide clavulanique. Leur site actif contient un résidu sérine. Ces enzymes sont également appelées TRI ou IRT ( $\beta$ -lactamases résistantes aux  $\beta$ -lactamases). Leur point isoélectrique est acide, proche de 5.

### **Groupe 2c (CAR-Y)**

Il inclut des beta-lactamases inhibées par l'acide clavulanique, et qui hydrolysent les carbénicillines à des taux de 75 % au moins, et aussi vite que la benzylpénicilline (ex: PSE-1, PSE-3, PSE-4 de *Pseudomonas aeruginosa*). Elles partagent les propriétés suivantes:

- tendance à hydrolyser les céphalosporines plus lentement que les pénicillines
- faible affinité pour la cloxacilline et l'aztreonam
- p<sub>i</sub> acide (4,3-7)

Les enzymes de ce groupe qui ont été séquencées appartiennent à la classe moléculaire A.

### **Groupe 2d (CLX-Y)**

Ce groupe inclut des  $\beta$ -lactamases qui hydrolysent la cloxacilline ou l'oxacilline plus vite que la benzylpénicilline, et qui sont généralement inhibées par l'acide clavulanique.

(ex: OXA-1 à 7, PSE-2 de *Pseudomonas aeruginosa*)

- ces enzymes sont inhibées par le chlorure de sodium 100 mM
- leur p<sub>i</sub> se situe environ entre 4,2 et 7,7
- leur séquence en acides aminés (OXA-2, et PSE-2) est suffisamment différente pour qu'elles aient été incluses dans une classe moléculaire D (74).

### **Groupe 2e (CEP-Y)**

Ce groupe inclut des céphalosporinases hydrolysant préférentiellement les céphalosporines de deuxième génération (« céfuroximes »), et qui sont inhibées par l'acide clavulanique.

Elles sont différentes du groupe 1 car inhibées par des taux faibles d'acide clavulanique.

Ex: certaines souches de *Proteus vulgaris* ou *penneri* mieux inhibées par l'acide clavulanique que par l'aztreonam.

Ce groupe est corrélé à la classe 1c de Richmond et Sykes (74,95).

### **Groupe 2f**

Ce groupe nouveau comprend des  $\beta$ -lactamases hydrolysant les carbapénèmes, qui sont faiblement inhibées par l'acide clavulanique, et dont le site actif contient une sérine.

### **Groupe 3 (MET-N)**

Il inclut des métalloenzymes inhibées par l'EDTA dont l'activité est restaurée par addition de cation bivalents,  $Zn^{++}$  en général (ex: enzyme L1 de *Sterrotrophomonas maltophilia*, anciennement *Xanthomonas maltophilia*).

-elles ne sont pas inhibées par l'acide clavulanique et le sulbactam

-aucunes d'entre elles ne contiennent de résidu sérine dans le site actif.

-elles sont capables d'hydrolyser l'imipénème.

Les enzymes de ce groupe qui ont été séquencées appartiennent à la classe moléculaire B.

### **Groupe 4 (PEN-N)**

Il contient les pénicillinases inhabituelles non inhibées par l'acide clavulanique.

Quatre de ces enzymes hydrolysent aussi fortement les carbénicillines et/ou la cloxacilline (ex: SAR-2 de *E.Coli*).

## **2.4.3 Relation entre classifications structurale et fonctionnelle:**

Dans leur dernière publication, Bush, Jacoby et Medeiros établissent un dendrogramme très intéressant entre parenté structurale et profil de substrat (voir annexe 2). La corrélation n'est pas toujours évidente: par exemple, les enzymes du groupe 2e présentent un profil de substrat de type céphalosporinase mais sont classées dans la classe A de Ambler qui renferment classiquement les sérine-pénicillinases.

Le tableau XV tiré de cette publication (22 bis) résume les différentes classifications proposées.

TABLE 1. Classification schemes for bacterial  $\beta$ -lactamases

Bush-Jacoby-Medeiros group	1989 Bush group (44)	Richmond-Sykes class (253)	Mitsuhashi-Inoue type (194) <sup>a</sup>	Molecular class (2, 121, 132)	Preferred substrates	Inhibited by:		Representative enzymes
						CA <sup>b</sup>	EDTA	
1	1	Ia, Ib, Id	CSase	C	Cephalosporins	-	-	AmpC enzymes from gram-negative bacteria; MIR-1
2a	2a	Not included	PCase V	A	Penicillins	+	-	Penicillinases from gram-positive bacteria
2b	2b	III	PCase I	A	Penicillins, cephalosporins	+	-	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	2b'	Not included except K1 in class IV	CXase	A	Penicillins, narrow-spectrum and extended-spectrum cephalosporins, monobactams	+	-	TEM-3 to TEM-26, SHV-2 to SHV-6, <i>Klebsiella oxytoca</i> K1
2br	Not included	Not included	Not included	A	Penicillins	=	-	TEM-30 to TEM-36, TRC-1
2c	2c	II, V	PCase IV	A	Penicillins, carbenicillin	+	-	PSE-1, PSE-3, PSE-4
2d	2d	V	PCase II, PCase III	D	Penicillins, cloxacillin	=	-	OXA-1 to OXA-11, PSE-2 (OXA-10)
2e	2e	Ic	CXase	A	Cephalosporins	+	-	Inducible cephalosporinases from <i>Proteus vulgaris</i>
2f	Not included	Not included	Not included	A	Penicillins, cephalosporins, carbapenems	+	-	NMC-A from <i>Enterobacter cloacae</i> , Sme-1 from <i>Serratia marcescens</i>
3	3	Not included	Not included	B	Most $\beta$ -lactams, including carbapenems	-	+	L1 from <i>Xanthomonas maltophilia</i> , Ccr-A from <i>Bacteroides fragilis</i>
4	4	Not included	Not included	ND <sup>c</sup>	Penicillins	-	?	Penicillinase from <i>Pseudomonas cepacia</i>

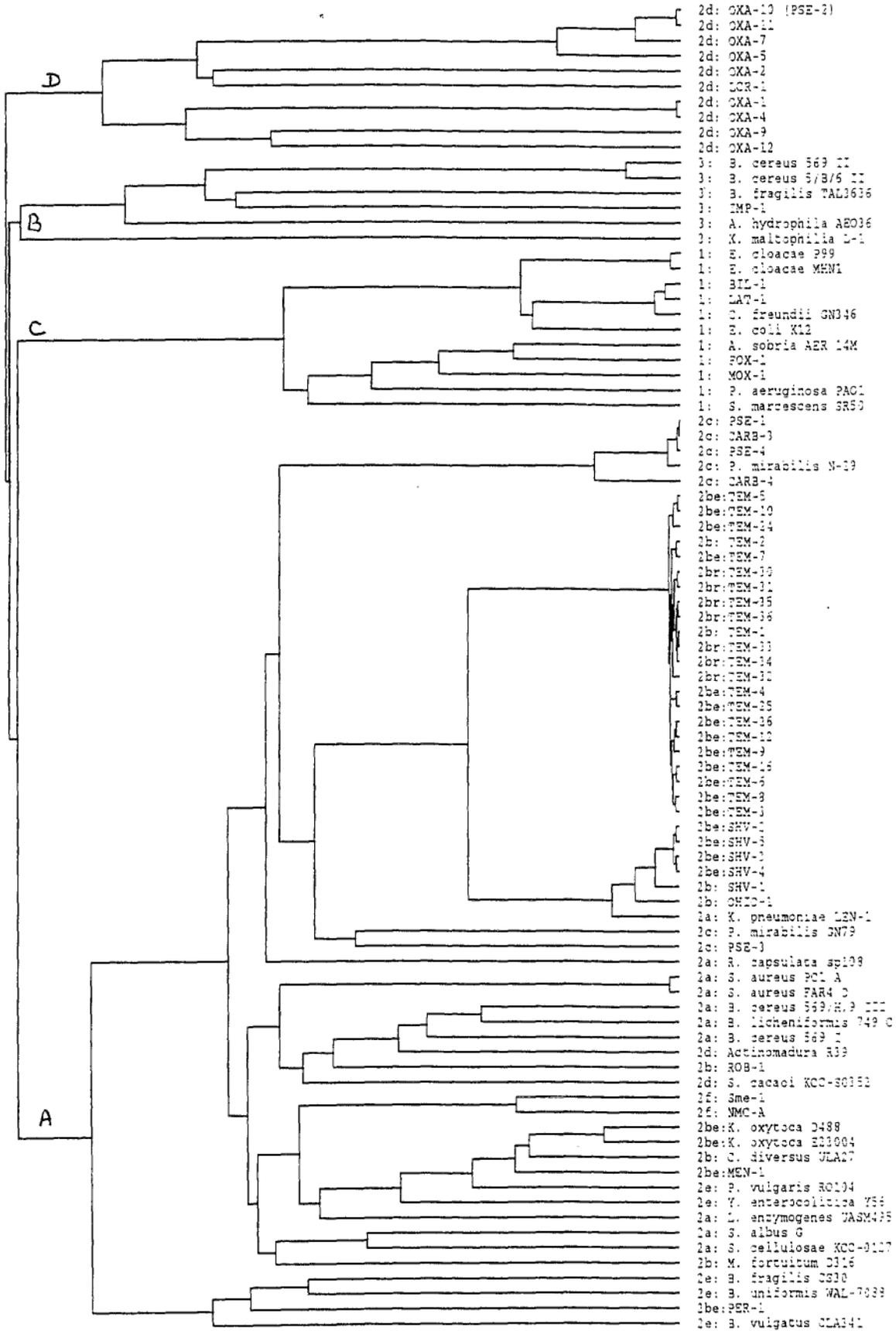
<sup>a</sup> CSase, cephalosporinase; PCase, penicillinase; CXase, cefuroxime-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase.

<sup>b</sup> CA, clavulanic acid.

<sup>c</sup> ND, not determined.

Tableau XV: Les différents types de classification des beta-lactamases  
D'après Bush, Jacoby et Medeiros (22 bis)

- 22 bis -



Annexe 2: Dendrogramme montrant les relations entre les analogies structurales des beta-lactamases et leurs propriétés fonctionnelles. D'après Bush, Jacoby et Medeiros (22 bis)

### 3- BETA-LACTAMASES ET ANAEROBIES

Parmi les bactéries anérobies strictes, la production de beta-lactamase a été rapportée dans de nombreuses espèces et représente le principal mécanisme de résistance aux beta-lactamines. Elle a été décrite en particulier dans les genres *Bacteroides* et *Prevotella*, ainsi que chez les espèces suivantes: *Porphyromonas ascaharolytica*, *Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium varium*, *Fusobacterium mortiferum*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium ramosum*, *Clostridium clostridiiforme* (64,81,104). On ne connaît pas de production de  $\beta$ -lactamase chez les cocci à Gram positif, ni chez les bacilles à Gram positif non sporulés. Ces beta-lactamases ont été le plus étudiées chez *Bacteroides fragilis*.

#### 3.1 Beta-lactamases de *Fusobacterium nucleatum* :

Certaines souches de *F. nucleatum* sécrètent une pénicillinase qui semble constitutive, inhibée par l'acide clavulanique et le sulbactam mais pas par le pCMB. Le point isoélectrique est acide. Cette pénicillinase semble de localisation intracellulaire (102). La fréquence des souches productrices est mal connue: 23 % (46), 52 % (69).

#### 3.2 Beta-lactamase des espèces du genre *Clostridium* :

*Clostridium butyricum* sécrète une pénicillinase exocellulaire décrite en premier par Magot (54). Cette pénicillinase est induite par la céfalotine, la céfoxitine et le moxalactam, mais pas par les pénicillines. Elle est inhibée par le sulbactam et le pCMB, mais pas par l'acide clavulanique (12,38,48).

*Clostridium ramosum* et *Clostridium clostridiiforme* sécrètent également une pénicillinase mais différente de la précédente: le PM est élevé (85.000 da); la localisation semble exocellulaire; elle est inhibée par l'acide clavulanique et le sulbactam, et peut être induite par la pénicilline (9,104).

Toutes ces enzymes semblent être codées par le chromosome bien qu'une beta-lactamase d'origine plasmidique ait été décrite chez *C. ramosum* (59).

### 3.3 Beta-lactamases des *Bacteroides* du groupe *fragilis* :

#### 3.31 *Bacteroides fragilis* :

Plusieurs types de beta-lactamases ont été décrites chez *B. fragilis* et sont résumées dans le tableau II.

(1) La première mise en évidence a été faite par Garrod en 1955 (36), puis Del Bene (27), Anderson et Sykes (4), Britz (16) ont décrit une activité de type céphalosporinase mais hydrolysant également faiblement les pénicillines. Cette beta-lactamase a été mieux caractérisée par Sato, Olsson, Eley, et Yotusji, qui ont trouvé un profil de substrat à peu près similaire de type céfotaximase (hydrolysant préférentiellement les méthoxyiminocéphalosporines, très peu les pénicillines, et respectant les céphamycines telles que céfoxitine, céfotétan et moxalactam). Les points isoélectriques le plus fréquemment retrouvés sont 4,7 et 4,9. Cette enzyme est inhibée par l'acide clavulanique, le sulbactam, la cloxacilline et le pCMB (33).

Cette céphalosporinase représente la beta-lactamase typique des *Bacteroides*. Elle est produite par au moins 60 % des souches de *Bacteroides non fragilis* et par plus de 90 % des souches résistantes. Les souches sauvages qui l'expriment à bas niveau sont sensibles aux carboxy- et aux uréidopénicillines ainsi qu'aux céphamycines; les souches hyperproductrices deviennent résistantes à la ticarcilline et à la piperacilline. Par ses propriétés, en particulier: inhibition par l'acide clavulanique et le sulbactam, et point isoélectrique acide, cette enzyme diffère notablement des céphalosporinases chromosomiques rencontrées chez les bacilles gram négatifs aérobies.

Sur un plan strictement fonctionnel, elle se comporte comme une céphalosporinase et appartient au groupe 2e de Bush, mais les travaux récents de Rogers (74 bis) montrent que sur un plan structural, cette enzyme appartient à un sous-groupe de la classe A de Ambler. Le terme de céphalosporinase ne semble donc pas totalement approprié.

(2) Sato (80) a décrit chez la souche GN11499 une beta-lactamase d'activité de type pénicillinase, de pi 6,9. Cette enzyme est également inhibée par les inhibiteurs classiques de beta-lactamase. La cloxacilline est un bon substrat de cette enzyme; aussi, elle est classée dans le groupe 2d de Bush. Ce génotype représente moins de 1 % des souches résistantes.

(3) Cuchural (25) a décrit une enzyme de point isoélectrique 8,1 dégradant la céfoxitine, résistant à l'acide clavulanique, et transférable à d'autres espèces de *Bacteroides*. Cette enzyme a été isolée chez une souche (TAL 4170) présentant des concentrations minimales inhibitrices très élevées à l'ensemble des beta-lactamines (CMI de l'amoxicilline > 128 µg/ml). C. Martin trouve également des CMI très élevées chez 7 souches dégradant la céfoxitine (51). Ce génotype est rencontré chez 2 à 4 % des souches résistantes.

(4) Cuchural (25), Bandoh (10), Hedberg (40) ont décrit une métallo-enzyme hydrolysant les céphalosporines, céphamycines et imipénème ("carbapénèmase"). Cette enzyme n'est pas inhibée par les inhibiteurs classiques des beta-lactamases et son activité est zinc dépendante. L'inhibition par l'acide éthylènediaminetétracétique (EDTA) est levée totalement par l'addition d'ions  $Zn^{++}$ , et partiellement par addition d'ions  $Co^{++}$  ou  $Mn^{++}$ . Yotusji (108) a décrit une enzyme présentant le même profil de substrat, résistante au sulbactam et à l'acide clavulanique, mais l'effet inhibiteur de l'EDTA n'a pas été évalué. Ce phénotype représente 2 ou 3 % des souches résistantes.

Le tableau III résume les différents phénotypes de résistance aux beta-lactamines rencontrés chez *B.fragilis* et leur fréquence relative (d'après L.Dubreuil, 30). Ce tableau intègre d'autres mécanismes de résistance telle que le défaut de porines.

Antibiotique Fréquence du phénotype (%)	Souche sauvage	Hyperproduction de $\beta$ -lactamase et/ou défaut de porine ou carbapénèmase silencieuse				Carbapénèmas
		80	10	6	1	
Amoxicilline	I/R	R	R	R	R	R
Amoxicilline + AC	S	S	S/I	I/R	R	R
Ticarcilline	S	R	S	R	R	R
Ticarcilline + AC	S	S	R	S	I	R
Pipéracilline	S	I/R	R	R	R	R
Pipéracilline + tazo	S	S	S	S	I	R
Céfalotine	R	R	R	R	R	R
Céfuroxime	R	R	R	R	R	R
Céfotaxime	I/R	R	R	R	R	R
Céfoxitine	I	I	I/R	R	R	R
Céfotétan	I	I/R	R	R	R	R
Imipénème	S	S	S	S	S	R

Tableau III Phénotypes de résistance aux  $\beta$ -lactamines  
chez *B.fragilis*

D'après L.Dubreuil (30)

Souche	Références	Profil de substrat											P.M.	pi	Profil d'inhibition					
		CER	CET	CFU	CTX	PEN	AMP	FOX	MOX	PIP	CLOX	IMP			CA	Sulb	Clox	I	pCMB	EDTA
GN 11477	SATO (78,79)	100	83	39	21	3	0,8	<1				<0,2	32.000	5,2	+		+	+	+	
B 34	OLSSON (28)	100	77			3		0						4,9						
	ELEY (30)													5,2/5,4	+	+	-	-	+	-
G 242	YOTUSJI (108)	100	40			1,9	<1						32.000	4,7	+	+		-	+	
GN 11499	SATO (80)	71	57			100	357	<1		47	271		41.500	6,9	+	+			+	
TAL 4170	CUCHURAL (25)										Deg			8,1	-	-				
G 237	YOTUSJI (108)	100	110			264	319	52	255	355	319	470	26.000	4,8	-	-		+	+	
TAL 2480	CUCHURAL (25)	100				330	260	23	75			210	44.000		-	-		+	+	+
TAL 2480	THOMPSON (99)												27.260							
GAI 30 144	BANDOH (10)	100				766				59		150	33.000	4,7	-	-			+	+
KSB 1468/90	HEDBERG (40)		35			100	120	9,2				2,9	31.000	4,5	-	-			+	+

CER	céfaloridine	PEN	pénicilline	CLOX	cloxacilline
CET	céfalotine	AMP	ampicilline	CA	acide clavulanique
CTX	céfotaxime	PIP	pipéracilline	Sulb	sulbactam
CFU	céfuroxime	MOX	moxalactam	I	iode
FOX	céfoxitine	IMP	imipénème	pCMB	parmercuribenzoate
DEG	dégradation de la céfoxitine			EDTA	acide éthylène diamine tétracétate

Tableau II: Les différentes  $\beta$ -lactamases décrites chez *Bacteroides fragilis*

### **3.32 Autres espèces du groupe *fragilis* :**

La plupart des souches sécrètent une céphalosporinase chromosomique constitutive comparable à celle des souches de *B.fragilis*, c.a.d. hydrolysant les oxyiminocéphalosporines, et plus faiblement les pénicillines. Cette céphalosporinase est inhibée par l'acide clavulanique et le sulbactam, sauf peut-être chez *B. distasonis* : Lacroix et Lamothe n'ont pas observé de restauration de sensibilité par addition d'acide clavulanique chez 9 souches de *B. distasonis* (50). Le point isoélectrique est également acide. De rares souches sécrètent une beta-lactamase hydrolysant la céfoxitine (73). Une carbapénèmase a été décrite chez une souche de *B.uniformis* (43). Les principales caractéristiques sont résumées dans le tableau IV.

### **3.33 Fréquence de production des beta-lactamases et sensibilité:**

La proportion de souches sécrétrices de beta-lactamase est estimée entre 95 et 100 % chez *Bacteroides fragilis* (8,46,56,69), et entre 70 et 100 % dans le groupe *fragilis*.

La production de beta-lactamase est bien corrélée avec les CMI dans le groupe *fragilis* (46). Dubreuil, Breuil, Dublanche et Sédallian (29) ont montré que la résistance des espèces du groupe *fragilis* aux beta-lactamines avait sensiblement progressé entre 1977 et 1992. Les principaux antibiotiques gardant une bonne activité sont le chloramphénicol, le métronidazole, la clindamycine (8,69), la tosufloxacinine et la témofloxacinine (7,8), et en ce qui concerne les beta-lactamines: l'imipénème et le mérépénème, et les associations beta-lactamine + inhibiteur de beta-lactamase (7,39,81,105).

### **3.34 Support génétique:**

Le support génétique des beta-lactamases a été étudié chez *Bacteroides fragilis*. Le gène Cep A gouverne la production de la céphalosporinase endogène (74'). On distingue plusieurs niveaux de production ce qui suppose l'existence de gènes de régulation: bas niveau (rare); niveau intermédiaire (70 % des souches); haut niveau (25 % des souches). Cette production n'est pas inductible (2,25). Le gène Cfx A code pour la production de la céphalosporinase hydrolysant la céfoxitine et résistante à l'acide clavulanique. Le gène codant pour la résistance aux carbapénèmes appelé Cfi A ou CCr A est silencieux chez la plupart des souches. L'activation de ce gène serait due à la transcription de séquences d'insertion (IS 1186) en amont du gène Cfi A (15). Le support génétique de la pénicillinase n'est pas connu; l'hypothèse d'un support plasmidique n'est pas exclue.

**3.35 Localisation cellulaire:** Ces enzymes sont situées dans l'espace périplasmique et ne se retrouvent presque pas dans les espaces extracellulaires. Elles sont vraisemblablement liées à la membrane cellulaire (40,67). Leur production est maximale en fin de phase exponentielle de croissance (80,67).

	Souche	référence	Profil de substrat (Vmax)*						PM	pi	Profil d'inhibition					
			CER	CET	CFU	CTX	PEN	AMP			FOX	CA	Sulb	Clox	I	pCMB
<b>B.thetaiotaomicron</b>	87	ELEY (33)								4,4		+	+	+		-
	11 souches	LEUNG (52)	100	140						4,6 (4,3-4,4)						
	6 souches	TIMEWELL (100)	100	100	15					4,25		+		+		+
	GN 11478	SATO (79)	100	81	50	7	1			4,9						
		TALLY (98) MASKELL (58)								4,6 (4,8) 4,3						
<b>B.vulgatus</b>	B 70	OLSSON (68)	100	70			1	0,6				+	+	+		+
	B 72	OLSSON (68)	100	238			3	8				+	+	+		+
	10 souches	LEUNG (52)	100	21						4,6						
	3 souches	TIMEWELL (100)	100	120	40					4,75 (4,65/5,05)						
	GN 11479	SATO (79) TALLY (98)	100	79	48	22	<1			4,5 32.000 4,6						
<b>B.distasonis</b>		SIMPSON (91)								4,9						
		DORNBUSH (28)								5,4						
		MASKELL (58)								5,6						
	MB 3389	DARLAND (26)	100	43			7									
	MB 3445	DARLAND (26)	100	48			9									
<b>B.ovatus</b>	8 souches	LEUNG (52) TALLY (98)	100	122	22					5,1 4 et 4,8						
		TALLY (98)								4 (4,6)						
		MASKELL (58)								5,1 (7,1)						
		SIMPSON (91)								6,3 (7,1)						
	B4	OLSSON (68)	100	84			2	0,8				+	+	+	+	+
<b>B.uniformis</b>	2 souches	LEUNG (52)	100	70	50					6,7						
	B 72	OLSSON (68)	100	134	38		6			5,6						
	29,86	OLSSON (68)	100	52	165		3		Dég	5,3						
	39,43	CUCHURAL (24)														
	7 souches	TIMEWELL (100)	100	190	60					4,35 (4,5)		+		+		+

\* taux relatifs d'hydrolyse = Vmax rapporté au Vmax de la céfaloridine

Tableau IV:  $\beta$ -lactamases décrites chez les autres espèces de *Bacteroides*

### 3.4 Beta-lactamases des *Prevotella* :

Les beta-lactamases des *Prevotella* sont moins connues que celles du groupe *fragilis* .On sait que leur activité est plus faible.Les CMI sont donc plus faibles (6,45), ce qui rend leur étude plus difficile.

#### 3.41 Fréquence des souches productrices:

L'étude de Jacobs, Spangler et Appelbaum (46) montre que si la fréquence globale dans le genre *Prevotella* peut être estimée à 60 %, il convient de faire une distinction entre les souches isolées en Europe (46 %) et les souches isolées aux Etats-Unis (71 %).Ces chiffres sont confirmés par d'autres études: 42 % en Europe (45); 60 % aux Etas-Unis (17). Le tableau V donne les fréquences par espèce décrites dans la littérature; le tableau VI donne les fréquences trouvées au centre hospitalier d'Annecy en 1994 et 95.Les espèces les plus productrices sont : *P.bivia* ; *P.buccae* ; *P.melaninogenica* ; *P.intermedia* ; *P.oralis*.

	JACOBS (41)	MARTIN (78)	SEDALLIAN (78)	JACOBS (40)	ZIANE (103)
<i>P.bivia</i>	84	74	68	79	62
<i>P.oris</i>			28		
<i>P.buccae</i>	40	52	61	41	60
<i>P.intermedia</i>	45	80	48	38	66
<i>P.melaninogenic</i>	40	33	37	35,5	
<i>P.loeschii</i>	19	28	31	29	
<i>P.oralis/buccali</i>	73	36	19	60	50
<i>P.disiens</i>	56				
<i>P.denticola</i>			66		50
<i>P.corporis</i>					33

Tableau V Fréquence des souches productrices (%)

Bactéries	1994			1995		
	Nombre	β-lactamase +	%	Nombre	β-lactamase +	%
<i>Prevotella spp</i>	1	0		2	0	
<i>P.oralis</i> et apparentés	6	1	16	2	0	
<i>P.bivia</i>	29	22	76	11	9	81
<i>P.disiens</i>	2	0		1	0	
<i>P.intermedia</i>	1	1		1	0	
<i>P.melaninogenica</i>	37	22	59	7	3	43
<i>P.corporis</i>	1	0		0		
<i>P.loeschii</i>	19	8	42	6	2	33
<i>P.denticola</i>	2	0		1	0	
<i>P.buccae</i>	22	13	59	4	3	75
<i>P.oris</i>	14	4	28	1	1	
<b>TOTAL</b>	<b>134</b>	<b>71</b>	<b>53%</b>	<b>34</b>	<b>18</b>	<b>53%</b>

Tableau VI *Prevotella* et β-lactamase à Annecy (A.Sédallian)

### 3.42 Profil de substrat:

La nature de la beta-lactamase a été assez longtemps controversée du fait de la difficulté à établir ce profil.

Les premières études qui faisaient appel à la technique micriodométrique de Sykes et Nordstöm ont mis en évidence une activité de type pénicillinase chez *P.melaninogenica*, *P.disiens*, *P.oralis* (ainsi que chez *Porphyromonas assacharolytica*) (61,62,63,76).

A l'inverse, Sherril et Mc Carty (89) ont décrit une activité majeure de type céphalosporinase chez *P. oralis* et les *Prevotella* du groupe III pigmentées en noir.

Tajima et coll.(97) ont également mis en évidence une activité de type céphalosporinase. Ils ont mesuré un faible taux d'hydrolyse des pénicillines (comparativement à la céfaloridine) chez 2 souches de *P. bivia*, mais n'ont mesuré aucune hydrolyse des pénicillines chez 1 autre souche de *P. bivia* et chez des souches de *P.intermedia*, *P.oralis* et *P.disiens*.

D'après les CMI et les résultats du test de détection microbiologique (technique de Rolfe et Finegold), il semble que le profil de substrat de cette beta-lactamase soit complexe (56,57,76,84,109). Les travaux de Timewell (100), ceux plus récents de Lacroix et Lamothe (49), et d'Appelbaum (5) montrent que l'enzyme est capable d'hydrolyser à la fois les céphalosporines et les pénicillines, et que l'activité "céphalosporinase" est plus marquée.

### 3.43 Profil d'inhibition:

Les beta-lactamases des *Prevotella* sont inhibées par l'acide clavulanique, le sulbactam, le tazobactam, la céfoxitine, le moxalactam, mais pas par la cloxacilline et le pCMB (5,49,100). Ceci les distingue des beta-lactamases des *Bacteroides* du groupe *fragilis*.

Sur cette base, Timewell a proposé de diviser les beta-lactamases des bactéries anaérobies à Gram négatif en 2 groupes I et II: le groupe I comprend les beta-lactamases des espèces proches de *Bacteroides fragilis* et qui sont inhibées par l'ensemble des inhibiteurs; le groupe II comprend des beta-lactamases telles que celles des *Prevotella* et des *Porphyromonas* qui ne sont pas inhibées par la cloxacilline et le pCMB et dont l'activité sur les pénicillines serait plus prononcée que les premières (100).

### 3.44 Point isoélectrique:

Les bandes principales trouvées le plus couramment se situent:

-à pH= 5,6-5,7 pour *P.bivia* (49,100).

-à pH=4,2-4,35 pour les autres espèces étudiées: *P.melaninogenica*, *P.oralis*, *P.intermedia*, *P.disiens* (5,101). Dans un travail non publié réalisé au laboratoire, L.Mirali retrouvait chez ces souches un point isoélectrique voisin de 4,5.

Appelbaum (5) trouve une bande à pH 5 chez une souche de *P.loeschii* avec un taux d'hydrolyse de la céfalotine particulièrement élevé.

Selon Timewell (101), la masse moléculaire se situerait aux alentours de 30 à 40.000 daltons.

Cependant en pratique, cet auteur trouvait des PM très élevés (>40.000.000 da). Selon lui, les molécules de beta-lactamases pourraient être complexées aux extrémités hydrophobes du lipopolysaccharide bactérien pour former des micelles. L'existence de tels micelles expliquerait ces PM très élevés et les difficultés rencontrées dans la détermination des points isoélectriques. Ces micelles peuvent être dissociés par un détergent tel que l'acide déoxycholiuque. Salyers (76) a décrit également une activité endocellulaire semblant intimement liée à la membrane et requérant l'usage de détergents.

### **Conclusion:**

Les principales caractéristiques sont résumées dans le tableau VII. Les valeurs de vitesse d'hydrolyse sont exprimées en terme de taux relatif d'hydrolyse. Les valeurs de  $V_m$  et  $K_m$  obtenues par Appelbaum figurent dans les tableaux tirés de son étude (Cf. annexe 1 pages 59 et 60). Le tableau VII condense les principales informations connues sur les beta-lactamases des espèces anaérobies d'après Nord et Hedberg (64) et indique leur position possible dans la classification de Bush. Concernant les  $\beta$ -lactamases des *Prevotella*, leur classification pose un problème. En effet, elles hydrolysent préférentiellement les céphalosporines, sont inhibées par l'acide clavulanique et ont un point isoélectrique acide. L'ensemble de ces caractères tend à les classer dans le sous-groupe 2e. Mais l'absence d'effet inhibiteur de la cloxacilline et du pCMB les exclut de ce groupe (30).

ESPECE	Références	Souche	Profil de substrat*									Profil d'inhibition						pi	PM (daltons)	
			CER	CET	CFU	CAZ	CTX	PEN	AMP	FOX	MOX	AC	Sulb	TZB	Clox	pCMB	I			EDTA
<i>Prevotella bivia</i>	LACROIX (49)	1127	100	27		28	26	51	<1	<1	+			-	-			5,6 (4,8-(5,0))(7)		
		396	100	25		41			<1	<1	+			-	-			5,6		
		537	100	55		81			<1	<1	+			-	-			5,6		
		TIMEWELL (101)	4 souches															5,7	30-40.000	
		TIMEWELL (100)	8 souches	100	40	50	120				0									
		APPELBAUM (5)	198	100	55	60	46	3	1			+	+	+	-	-	-	5,6		
			690	100	31	45	66	4	4			+	+	+	-	-	-	5,6		
			691	100	25	29	40	2	1			+	+	+	-	-	-	5,6		
			683																5,6	
			687																5,6	
		MARTIN (55)	20 souches															7,5-8 (12 souches)		
																		5,3;5,6;6 (2 souches)		
																		4,9 ; 5,3		
																	4,2 ; 4,35	30-40.000		
<i>Prevotella melanino.</i>		3 souches																		
		2 souches	100	40	50	120														
		APPELBAUM (5)	184	100	67	86	76	4	2			+	+	+	-	-	-	4,3		
			192	100	96	24	58	2				+	+	+	-	-	-	4,8		
		637															4,3			
<i>Prevotella oralis</i>	TIMEWELL (101)	3 souches																4,2 ; 4,35	30-40.000	
	TIMEWELL (100)	2 souches	100	20	10															
	APPELBAUM (5)	182	100	55	50	26	7	6			+	+	+				4,3			
<i>Prevotella intermedia</i>	TIMEWELL (100)		100	40	50	120				0										
	APPELBAUM (5)	820	100	65	56	145	12	13			+	+	+	-	-	-	4,2			
			837	100	116	69	58	10			+	+	+	-	-	-	4,2			
			848															4,2		
			350															4,2		
<i>P.loeschii</i>	APPELBAUM (5)	201	100	826	98	110					+	+	+	+			5			
<i>Prevotella disiens</i>	APPELBAUM (5)	802	100	36	19	35					+	+	+	-	-	-	4,2			
			867	100	33	62	28				+	+	+	-	-	-	4,9			
			868															4,2		
			870															4,2		

Tableau VII:  $\beta$ -lactamases décrites chez les *Prevotella*

	Profil de substrat	Inductibilité	Profil d'inhibition						pi	PM	Localisation	o.génétique	Bush
			FOX	AC	Sulb	pCMB	Clox	I					
<i>Bacteroides fragilis</i>	céphalosporinase	constitutive	+	+	+	+	+	+	4,9	32.000	esp.périplasmique	chromosomique	2e
	pénicillinase (1)			+	+	+		+	6,9	41.500			2d
	large spectre			-	-	-		+	8,1				1
	métallo-enzyme			-	-	-		+	+	4,5 - 4,8	26 - 33.000		3
<hr/>													
<i>Prevotella</i>													
* <i>bivia</i>	céphalosporinase		+	+	+	-	-		5,6 - 5,7	30 - 40.000	esp.périplasmique		?
* autres espèces	céphalosporinase		+	+	+	-	-		4,2 - 4,4				?
<hr/>													
<i>Fusobacterium nucleatum</i>													
	pénicillinase	constitutive	-	+	+	-			4,8	21 -26.000	intracellulaire à 80 %		2a
<hr/>													
<i>Clostridium</i>													
* <i>butyricum</i>	pénicillinase	inductible (2)		-		+			4,4-4,5	85.000	extracellulaire	chromosomique	4
* <i>butyricum</i>	pénicillinase		-	+	+	+			4,4	32.000	extracellulaire	chromosomique	2c
* <i>clostriforme</i>	pénicillinase	inductible (3)	-	+	+	-			4 - 4,5	85.000	extracellulaire	chromosomique	2d
* <i>ramosum</i>	pénicillinase	inductible (3)	+	+	+	-			4 - 4,5	85.000	extracellulaire	chromosomique	2d

tableau VIII :  $\beta$ -lactamases des ANAEROBIES

(1) hydrolysant la cloxacilline

(2) inductible par la céfalotine, la céfoxitine et le moxalactam, mais pas par les pénicillines

(3) inductible par la pénicilline

## **4- AUTRES MECANISMES DE RESISTANCE AUX BETA-LACTAMINES**

### **4.1. Modification des PLP**

Il a été montré chez *C.perfringens* que la résistance à la pénicilline était liée à une diminution de l'affinité des PLP-1 (99). Des PLP modifiées ont été observées chez des espèces de *Bacteroides* (72). Wexler & Halebian (106) ont de même mis en évidence une altération de la PLP-1 chez des souches céfoxitine-résistantes de *B.fragilis* .

### **4.2. Imperméabilité de la membrane externe**

La non-corrélation entre production de  $\beta$ -lactamase et résistance à la céfoxitine a été montrée chez des souches de *B.fragilis* présentant des sensibilités diminuées à la céfoxitine. Un mécanisme de type imperméabilité de membrane est retenu pour expliquer cette discordance (63).

Ce mécanisme de résistance pourrait être assez fréquemment associé à la production de beta-lactamase qui reste le mécanisme principal chez les espèces anaérobies à Gram négatif.

**PARTIE**

**EXPERIMENTALE**

**MATERIEL**

**&**

**METHODES**

## 1- LES SOUCHES BACTERIENNES

### 1.1 Provenance et répartition des souches

Nous avons étudié la sensibilité de 35 souches de *Prevotella* isolées de prélèvements pathologiques à l'hôpital d'Annecy entre 1992 et 1994, plus une souche de référence: *Bacteroides fragilis* ATCC 25 285. Les 35 souches de *Prevotella* ont été sélectionnées sur 2 critères:

1-détection positive d'une  $\beta$ -lactamase par le test céfinase°.

2-CMI à l'ampicilline > 4 par la technique de l'épsilomètre ou E-test.

Le tableau IX indique la répartition des souches par espèces, l'origine par type de prélèvement et par service, et la CMI à l'ampicilline par le E-test.

### 1.2 Identification et conservation:

Toutes les souches utilisées ont été identifiées au laboratoire selon la démarche diagnostique décrite en première partie. L'identification et l'antibiogramme standard ont fait appel aux dispositifs commerciaux suivants:

-Anaérodiscs (Biomérieux)

-bile	5 $\mu$ g	rèf 5730.1
-vert brillant	100 $\mu$ g	rèf 5731.1
-kanamycine	1000 $\mu$ g	rèf 5732.1
-vancomycine	5 $\mu$ g	rèf 5737.1
-pénicilline	2U	rèf 5733.1
-colimycine	10 $\mu$ g	rèf 5734.1
-érythromycine	60 $\mu$ g	rèf 5735.1
-rifampicine	15 $\mu$ g	rèf 5736.1

-galerie Api 20 ANA (Biomérieux<sup>©</sup>) pour l'étude de la fermentation des sucres.

-galerie Rapid ANA (Biotest<sup>©</sup>) pour l'étude des activités enzymatiques.

-un chromatographe PACKARD 427 pour l'analyse des extraits éthylés et méthylés en chromatographie phase gazeuse. La phase stationnaire est un liquide peu volatil: SULPECO SP 1200; la phase mobile est réalisée par un courant d'azote.

Dans notre travail, nous n'avons pas procédé à de nouvelles identifications, sauf à des contrôles de pureté: coloration de Gram, contrôle aérobie notamment.

Les souches ont été conservées en bille à - 70°C, ou à température ambiante pour les souches les plus récentes.

	Souche	Référence	Prélèvement	Service	Année	E-test ampicilline
<i>P. bivia</i>	ARB 3	417	ostéite	gynécologie	92	64
	COG 2a	X	PV	gynécologie	93	
	KOG 2b	409	PV	maternité	92	8
	PEC 2a	375	PV	gynécologie	93	12
<i>P. buccae</i>	BOY 2	192	BA	pneumologie	93	16
	CAV 3	119	parotidite	infectiologie	94	32
	COG 1	42	PV	gynécologie	93	16
	COS 1a	408	PV	gynécologie	93	4
	DUP 1b	57	CBT	réanimation	94	
	HOP 1	15	liq.pleural	réanimation	93	24
	LOI 3	130	LBA	gastroentérologie		64
	PRO 3a	75	liq.péritonéal	chirurgie	94	
	BOU 2	133	PV	maternité	94	24
	REY 2b	310	CBT	réanimation	92	64
	<i>P. corporis</i>	LOP 1	482	panaris	externe	93
DUP CN1		1232		réanimation	94	48
<i>P. disiens</i>	BER 3a1	126	PV	externe	93	6
<i>P. denticolae</i>	PIC 1b2	391	sinus	réanimation	93	32
<i>P. intermedia</i>	DUP 2	62	brosse	réanimation	94	
	MOU 2	59	phlegmon	accueil	94	4
<i>P. loeschii</i>	ARM 1b	178	PV	externe	93	8
	DAN	142	plaie pied	neurologie	94	6
	HOS 1b	405	PV	accueil	93	8
	LOI 1b	130	LBA	gastroentérologie	93	4
	PAR 4	168	LBA	gynécologie	93	6
<i>P. melanino.</i>	BOY 3	192'	BA	pneumologie	93	8
	CHa 5b	139	mandibule	ORL	94	8
	CHO 2a	117	BA	neurologie	93	4
	DUP 2'	55	LBA	réanimation	94	64
	PIC 1a1	391	sinus	réanimation	93	4
	MEG 4	307	LBA	infectiologie		8
<i>P. oris</i>	CHA 1b	412	sinus	réanimation	93	
	PER 2	297	kyste	gynécologie	93	8
	VAN	237	BA	pneumologie	93	
	HEM 1b	285	thoracique	infectiologie	94	

PV = prélèvement vaginal  
 CBT = sonde endotrachéale des malades sous ventilation assistée  
 LBA = lavage bronchoalvéolaire  
 BA = bronchoaspiration

Tableau IX : Souches bactériennes

## **2- CONDITIONS DE CULTURE**

### **2.1. Anaérobiose:**

Plusieurs systèmes nous ont permis d'obtenir une atmosphère anérobie:

-les milieux liquides tels que le bouillon Rosenow étaient dégazés extemporanément (régénération 20 minutes à bain-marie bouillant),ensemencés, puis bouchés à la paraffine.

-les milieux solides gélosés étaient placés soit en sachets plastiques avec générateur de gaz (système Anaerocult<sup>o</sup> IS, MERCK), soit en chambre anaérobie. Nous utilisons une enceinte anaérobie ( Bactron IV, SERLABO) étanche avec sas d'accès, alimentée par des sources de gaz comprimés (N<sub>2</sub>= 85 %, CO<sub>2</sub>= 10 %, H<sub>2</sub>= 5 %). Cette installation permet d'assurer de façon permanente une atmosphère anaérobie de qualité.

Pour optimiser les conditions de culture, les boîtes étaient préincubées plusieurs heures en anaérobiose à 37°c avant ensemencement.

### **2.2. Température:**

Toutes les cultures ont été réalisées à 37 °C.

### **2.3. Milieux de culture:**

Nous avons utilisé de façon courante les milieux suivants:

-bouillon de Rosenow régénéré, bouché sous paraffine, utilisé à des fins d'enrichissement et de conservation. Ce bouillon est préparé au laboratoire.

-gélose Columbia au sang de mouton (Biomérieux réf 4304) utilisé quotidiennement pour le réisolement et la purification des colonies.

-milieu de Wilkins-Chalgreen (Oxoid). Ce milieu, en bouillon et en gélose solide, est utilisé pour la détermination des concentrations minimales inhibitrices des antibiotiques vis-à-vis des anaérobies par la technique de dilution en gélose.

-le milieu TGY (Pasteur réf 54 620) sous forme liquide est utilisé pour préparer des subcultures pour analyse chromatographique.

### 3- LES ANTIBIOTIQUES

Pour la détermination des sensibilités de nos souches aux antibiotiques et pour la mise en évidence de l'activité  $\beta$ -lactamase , nous avons utilisé les  $\beta$ -lactamines et les inhibiteurs de  $\beta$ -lactamase suivants:

- ampicilline TOTAPEN° (lab. BRISTOL)
- pipéracilline PIPERILLINE (lab. LEDERLE)
- céfalotine KEFLIN° (lab. LILLY)
- céfuroxime CUROXIME° (lab. GLAXO)
- céfoxitine MEFOXIN° (lab. MERCK SHARP DOHME CHIBERT)
- céfotaxime CLAFORAN° (lab. BEECHAM)
- acide clavulanique (lab. BEECHAM)
- sulbactam (lab. PFIZER)

Je remercie les laboratoires GLAXO, MERCK, LEDERLE, et LILLY qui nous ont gracieusement fourni des échantillons de leur produit.

Pour toutes les mesures spectrophotométriques, nous avons utilisé en plus le réactif nitrocéfine en phase liquide (lab. OXOID).

### 4- CONCENTRATIONS MINIMALES INHIBITRICES

Les concentrations minimales inhibitrices des antibiotiques ont été déterminées par la technique de dilution en milieu gélosé. C'est la technique de référence pour les bactéries anaérobies; elle a été standardisée par le NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards).

Nous avons utilisé le milieu de Wilkins-Chalgren gélosé (OXOID) additionné à 5 % de sang laqué de mouton. Les antibiotiques testés ont été: ampicilline, ampicilline-acide clavulanique, pipéracilline, céfuroxime, céfuroxime-sulbactam, céfoxitine, céfotaxime, céfotaxime-sulbactam. Les dilutions ont été réparties de 0,125 à 128  $\mu\text{g/ml}$ . L'acide clavulanique et le sulbactam ont été introduits à une concentration unique de 2  $\mu\text{g/ml}$ . Les inoculums ont été ajustés au néphélomètre à 0,5 Mc Farland (soit environ  $1,5 \cdot 10^8$  UFC/ml) et comparés à un témoin d'opacimétrie préparé comme décrit dans le Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual. Les dépôts des suspensions bactériennes ont été réalisés à l'ensemencement de STEERS. Une souche de référence (*Bacteroides fragilis* ATCC 25 285) a été introduite dans chaque essai. L'incubation des boîtes s'est faite en chambre anaérobie pendant 48 heures.

## 5- CROISSANCE BACTERIENNE

Nous avons tenté de mesurer la croissance bactérienne chez 4 souches de *Prevotella* par une technique de numération des unités formant colonies (UFC). La culture en bouillon Rosenow ne permet pas en effet d'effectuer une mesure d'opacimétrie.

Les souches testées étaient: 3 souches de *P.bivia* (rèf. X, 375, 417) et 1 souche de *P.oris* (rèf 412). Nous avons procédé de la façon suivante (voir fig.2):

-A  $T_0$  nous avons réalisé un inoculum de départ (I) de 0,5 Mc Farland en bouillon Wilkins-Chalgreen (1).

-Un aliquot de cette suspension a fait l'objet de dilutions successives de raison 10 dans le même milieu. Chaque dilution a étéensemencée en 1 strie à l'oëse de 1  $\mu$ l sur gélose Columbia au sang (2). Après 48 h d'incubation en anaérobiose les UFC ont été numérées visuellement (3).

-Le reste de la suspension de départ a été réparti dans 10 bouillons de Rosenow à raison de 1,3 ml dans 12 ml de façon à réaliser une dilution au 1/10 ème de l'inoculum I de départ (4). Les Rosenow ont été incubés en anaérobiose à 37°C pendant des temps variant de 4 à 48 heures (5). Un aliquot a alors été prélevé et dilué de 10 en 10 en bouillon Wilkins-Chalgreen; les dilutions ont étéensemencées sur gélose au sang de la même façon que pour la suspension de départ (6). A 48 h d'incubation, les UFC ont été numérées comme précédemment.

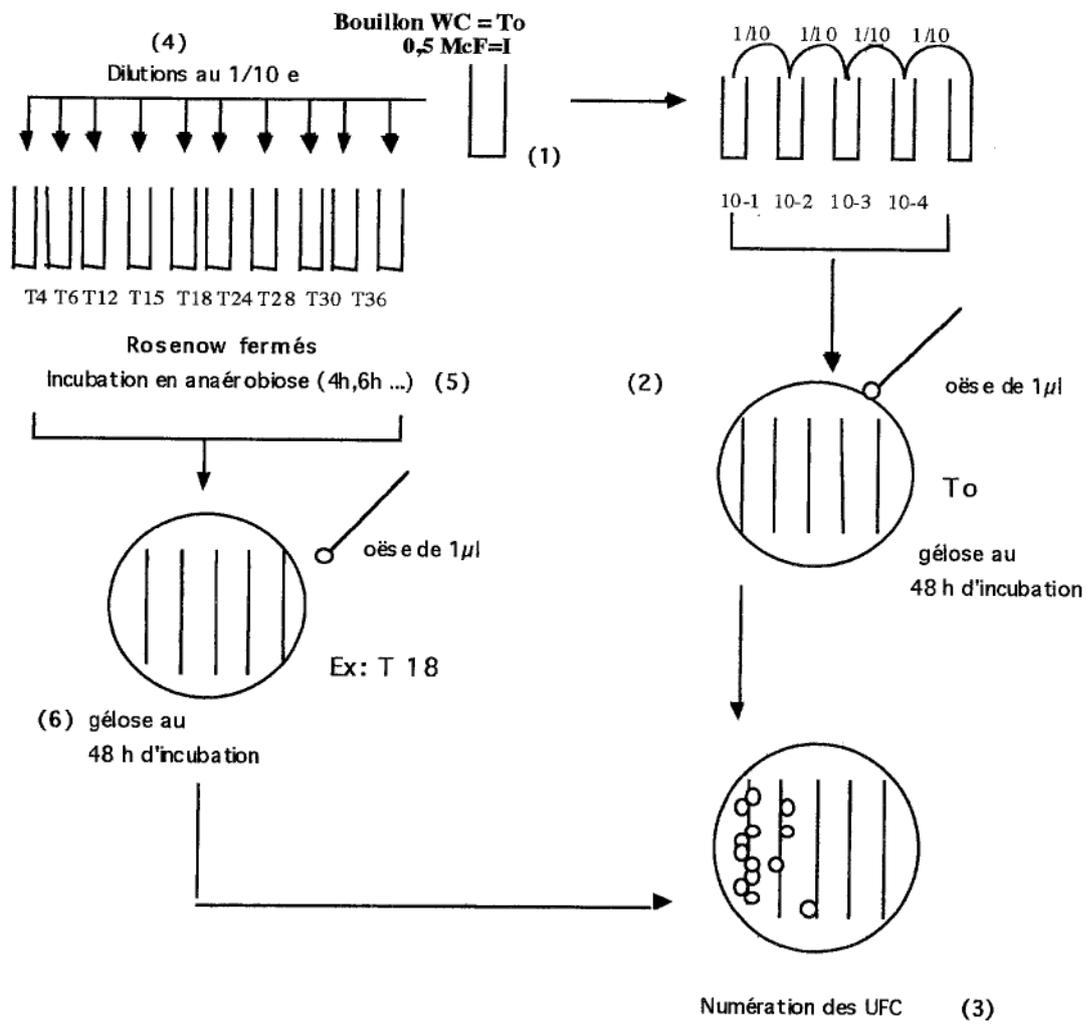


Figure 2 : Mesure de la croissance bactérienne

## 6- EXTRACTION DES BETA-LACTAMASES

Nous avons cultivé nos souches sur gélose Columbia au sang. A partir de 4 boîtes ensemencées richement nous obtenons 4,5 à 5 ml d'extrait de la manière suivante:

Les boîtes sont incubées à 37°C pendant une période de temps variant entre 48 et 72 h selon les espèces. Les colonies sont ensuite récoltées à l'écouvillon, lequel est exprimé dans 4,5 ml de tampon phosphate (PBS 0,15M).

A ce stade, les suspensions obtenues peuvent être conservées du jour au lendemain à +4°C ou congelées à -70°C si l'extraction n'est pas faite dans un délai court. Les suspensions sont ensuite centrifugées 20 minutes à 4000 rpm et les culots sont lavés 2 fois dans le même tampon phosphate. Le dernier culot est repris dans 4,5 ml de PBS. Cette suspension est alors traitée aux ultrasons (modèle Vibracel TM, BIOBLOC SCIENTIFIC ©) selon le cycle suivant: 3 sonications de 30 secondes chacune à une fréquence de 20 kHz., avec refroidissement dans la glace entre chaque passage. L'ultrasonat obtenu est enfin centrifugé à +4°C, pendant 1 heure; les surnageants sont aliquotés en fractions de 500 µl ou 1 ml et congelés à -70 °C.

La dernière étape de centrifugation est particulièrement importante pour séparer l'enzyme d'une grande quantité des impuretés qui l'entourent.

Lors de nos premiers essais, nous avons centrifugé les extraits à 10.000 rpm (protocole 1), puis 17.000 rpm. Ceci représentait la capacité maximum de vitesse dont nous disposions au laboratoire. Les préparations obtenues nous ont permis d'effectuer des mesures spectrophotométriques dans le domaine visible en utilisant comme substrat la nitrocéfine. Mais les mesures dans le domaine de l'ultraviolet n'ont donné aucun résultat. Ceci est probablement lié à la présence résiduelle de protéines qui absorbent aux longueurs d'onde de 260 et 280 nm et peuvent donc interférer dans les mesures. Par la suite, nous avons préparé les extraits enzymatiques en centrifugeant à 25.000 rpm (soit 39 550 g, protocole 2) sur une centrifugeuse LKB (rotor RPW 65 T). Cette centrifugation s'est opérée dans le service du Pr Le Noc (section de virologie) au CHU de Grenoble, grâce à l'appui de Mr B.Chanzy.

Nous avons dès lors obtenu des préparations suffisamment pures pour effectuer toutes nos mesures spectrophotométriques entre 230 et 280 nm. Aucune purification supplémentaire n'a été effectuée; l'ensemble de notre travail a été réalisé à partir des extraits bruts.

Le schéma de la figure 3 résume les différentes étapes de l'extraction.

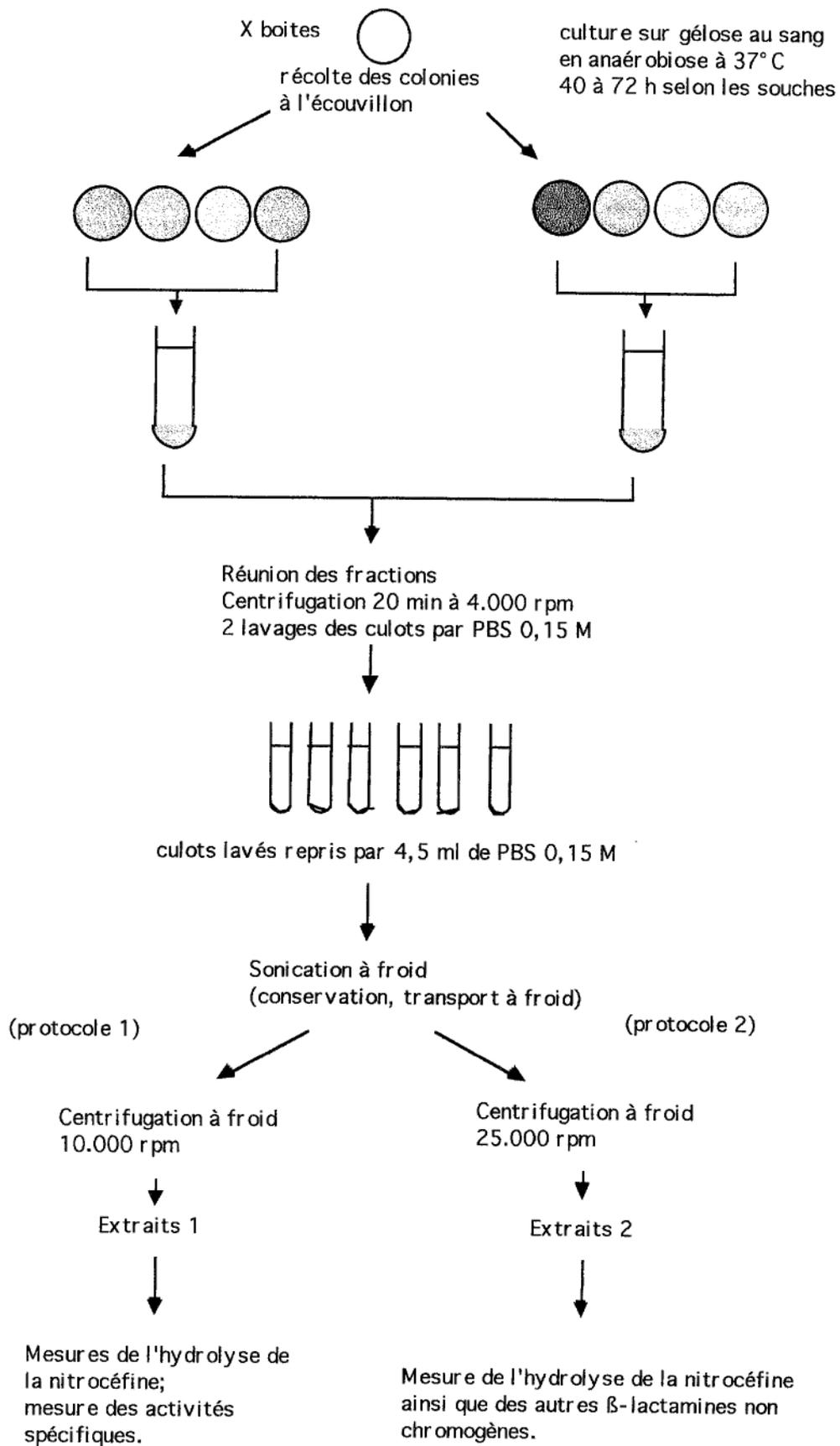


Figure 3 - Modalités d'extraction des β-lactamases

## 7- DOSAGE DES PROTEINES

Les protéines ont été dosées par une technique dérivée de celle de Biuret sur automate Kodak Ektachem 250 (KODAK).L'étalonnage est réalisé à partir d'une gamme de sérum-albumine.

## 8- DETERMINATION SPECTROPHOTOMÉTRIQUE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE

La vitesse initiale a été déterminée par une mesure spectrophotométrique directe selon le protocole suivant:

500  $\mu$ l de nitrocéphine à concentration saturante (50  $\mu$ g/ml soit  $10^{-4}$  M) sont préincubés environ 10 min à 37°C.250  $\mu$ l d'extrait enzymatique brut sont ajoutés.L'extrait peut être dilué si besoin est en tampon phosphate 0,15 M à pH 7.L'augmentation de l'absorbance de la préparation à 486 nm est suivie en continu (mode cinétique) sur un spectrophotomètre (modèle UV 1601, ROUCAIRE) pendant 5 à 10 minutes.Toutes les mesures sont effectuées en double.La vitesse initiale exprimée en  $\Delta A$ /min est obtenue à partir de la pente à l'origine.

La concentration d'activité catalytique de l'extrait est calculée par l'équation suivante:

$$\text{Activité (U/ml)} = \frac{V_i \cdot 10^6}{\epsilon \cdot l} \times \frac{V_t}{V_e} \times d$$

- $V_i$  = vitesse initiale ( $\Delta A$ /min)
- $l$  = trajet optique (cm)
- $\epsilon$  = coefficient d'extinction molaire  $l \cdot \text{mol}^{-1}$
- $10^6$  = facteur de conversion en  $\mu$ mol
- $V_t$  = volume réactionnel total (l)
- $V_e$  = prise d'essai d'enzyme (ml)
- $d$  = facteur de dilution.

L'activité spécifique exprimée en U/mg de protéines est calculée en rapportant la concentration d'activité catalytique au taux de protéines.

L'unité de beta-lactamase est la quantité d'enzyme capable d'hydrolyser 1  $\mu$ mole de nitrocéfine par minute, à pH 7 et 37°C.

## 9- PRODUCTION DE BETA-LACTAMASE EN FONCTION DU TEMPS

Pour cette étude, nous avons choisi au hasard 1 souche de chaque espèce de *Prevotella*, parmi celles dont nous disposions. Les souches testées sont les suivantes:

*P.bivia* (X), *P.buccae* (75), *P.corporis* (1232), *P.denticolae* (126), *P.disiens* (391), *P.intermedia* (62), *P.loeschii* (130), *P.melaninogenica* (55), *P.oris* (412).

Pour chacune de ces souches, nous avons fait varier le temps d'incubation en anaérobiose et mesuré l'activité  $\beta$ -lactamase selon le protocole suivant:

-Une culture pure de 48 heures est récoltée et mise en suspension en bouillon Wilkins Chalgren. Ceci représente l'inoculum de départ; cet inoculum n'est pas quantifié.

-Nous ensemençons au temps  $T_0$  26 boîtes de gélose au sang préincubées plusieurs heures en anaérobiose: 1 ml de l'inoculum préparé est étalé en râteau sur chacune des boîtes.

-Après 24 heures de culture (temps  $T_{24}$ ), les colonies sont récoltées à l'écouvillon à la surface de 2 boîtes. Puis toutes les 4 heures, 2 boîtes sont sorties de l'étuve et raclées de la même façon. Ceci est effectué pendant 48 heures, soit jusqu'au temps  $T_{72}$ .

-La  $\beta$ -lactamase est extraite selon le protocole décrit précédemment, l'activité enzymatique est calculée à partir de la vitesse initiale d'hydrolyse de la nitrocéfine et exprimée en fonction du taux de protéines en terme d'activité spécifique.

## 10- ETUDE D'INDUCTION

Nous avons testé l'effet inducteur de deux  $\beta$ -lactamines: la céfoxitine et l'ampicilline chez un nombre restreint de souches.

Pour ce faire, nous avons cultivé 3 souches de *P.buccae* (ref 75, 15, et 192) sur des milieux gélosés contenant ou non de l'antibiotique:

-gélose Wilkins-Chalgren + 5 % sang de mouton

-gélose Wilkins-Chalgren + 5 % sang de mouton + céfoxitine (1  $\mu$ g/ml)

-gélose Wilkins-Chalgren + 5 % sang de mouton + ampicilline (4  $\mu$ g/ml).

Les taux de céfoxitine et d'ampicilline ont été choisis en fonction des CMI des souches pour ces antibiotiques de sorte que le taux retenu soit égal au quart de la CMI correspondante.

Les activités spécifiques sont comparées pour les trois types d'extraits.

## **11- PROFIL DE SUBSTRAT**

### **11.1.Choix des substrats antibiotiques**

Les différentes  $\beta$ -lactamines testées comme substrat de l'enzyme sont les mêmes que celles utilisées lors de la détermination des CMI.

En outre, nous avons ajouté une céphalosporine de première génération (céfalotine) servant de substrat de référence.

### **11.2.Choix des longueurs d'onde**

Pour chaque substrat, nous avons choisi la longueur d'onde en s'appuyant sur les données de la littérature et en comparant les spectres d'absorption respectifs du substrat et du produit d'hydrolyse.

### **11.3.Mesure des vitesses initiales**

Les vitesses initiales étaient déterminées par mesure spectrophotométrique directe en continu à une concentration de substrat de 100  $\mu\text{M}$  pour les céphalosporines et de 1 mM pour l'ampicilline. La prise d'essai de substrat était de 500  $\mu\text{l}$ ; la prise d'essai d'enzyme était de 250  $\mu\text{l}$ ; celle-ci était utilisée pure ou diluée selon les cas. La figure 4 montre les courbes d'hydrolyse des différents substrats chez une même souche.

### **11.5.Détermination des constantes de Michaëlis Km**

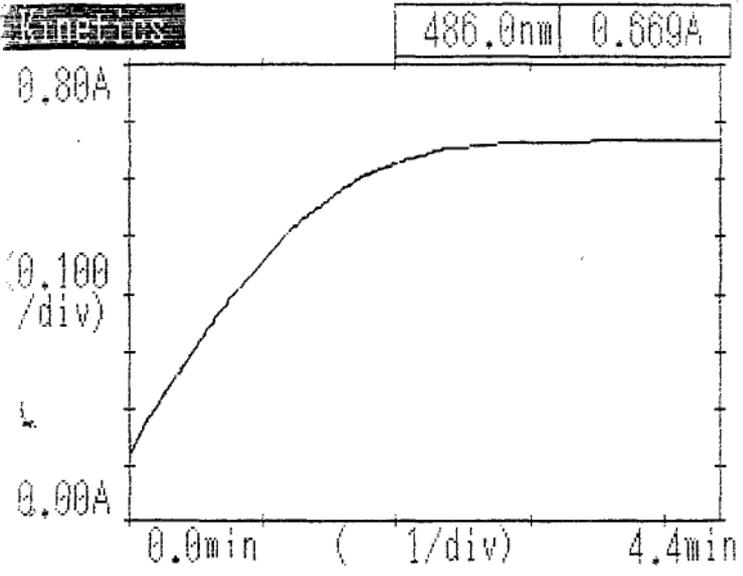
Lors de chaque essai, nous avons incubé à 37 °C, 1 ml de substrat en présence d'une prise d'essai calibrée d'enzyme (5 à 15 mU) sous un volume de 250  $\mu\text{l}$ . Toutes les mesures ont été effectuées sur des extraits décongelés du jour.

Toutes les dilutions étaient réalisées en tampon phosphate 0,15M. Les concentrations en substrat utilisées variaient entre 10 et 100  $\mu\text{M}$  pour la céfalotine, entre 5 et 35  $\mu\text{M}$  pour le céfuroxime, entre 15 et 150  $\mu\text{M}$  pour le céfotaxime, entre 50 et 2000  $\mu\text{M}$  pour l'ampicilline. Chaque gamme comportait au moins 7 points, et deux gammes au minimum ont été testées systématiquement pour chaque souche vis-à-vis de chaque antibiotique. Une gamme étalon était réalisée dans les mêmes conditions. Après une période d'incubation adéquate, les tubes étaient plongés dans un bac de glace pour arrêter la réaction.

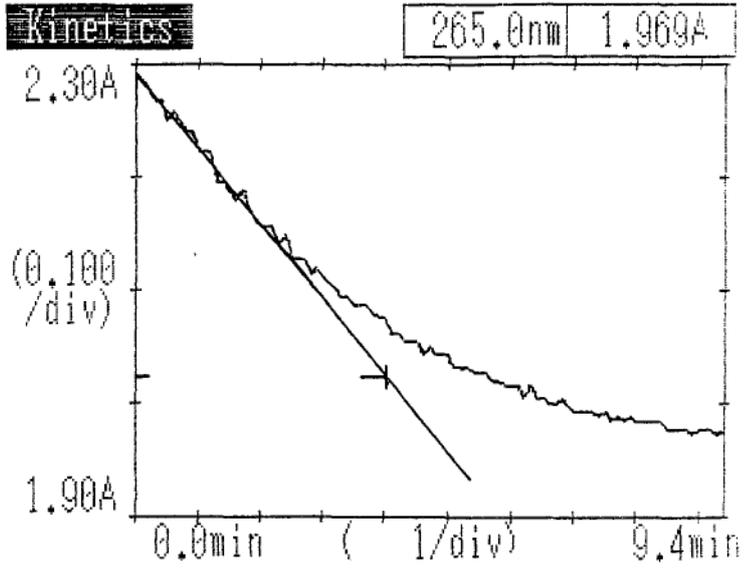
Toutes les valeurs ont fait l'objet d'une double détermination. Le traitement des résultats a consisté à mettre en oeuvre une régression linéaire à partir des points expérimentaux par la méthode des moindres carrés. Les représentations de Lineweaver & Burk, Haedie et Hofstee, Eisenthal & Cornish-Bowden ont permis le calcul des Km en rejetant les points les plus aberrants. La figure 5 illustre la détermination du Km à partir de ces trois représentations, pour l'hydrolyse du céfotaxime par la  $\beta$ -lactamase de la souche 62.

#### **11.4.Détermination des vitesses maximales d'hydrolyse $V_m$**

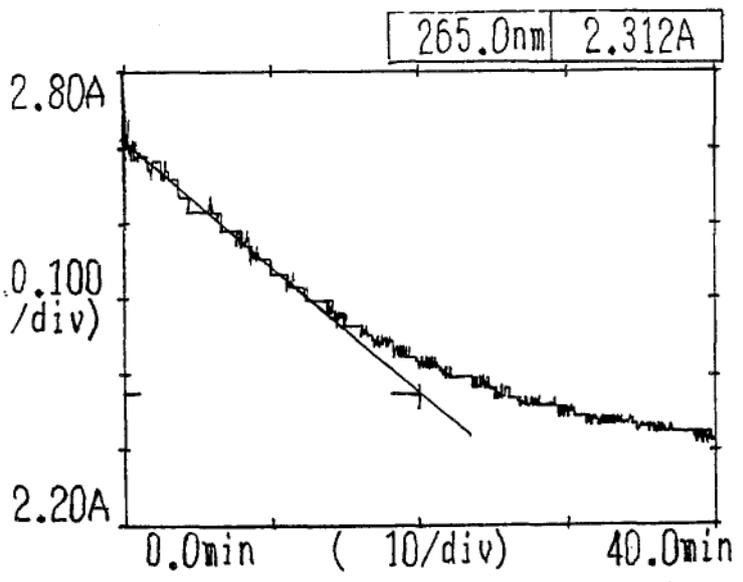
Les valeurs de  $V_m$  ont été calculées d'après l'équation de Michaelis-menten et exprimées en  $\mu\text{mol}$  de substrat hydrolysé par minute et par unité d'enzyme.



Hydrolyse de la nitrocéfine (S=100  $\mu$ M; V<sub>s</sub>=500  $\mu$ l) par la souche 192 (extrait pur; V<sub>e</sub>= 250  $\mu$ l).



Hydrolyse du céfuroxime (S=100  $\mu$ M; V<sub>s</sub>=400  $\mu$ l) par la souche 192 (extrait pur; V<sub>e</sub>=250  $\mu$ l).



Hydrolyse du céfotaxime (S=100  $\mu$ M; V<sub>s</sub>=500  $\mu$ l) par la souche 192 (extrait dilué au 1/2; V<sub>e</sub>=250  $\mu$ l).

Figure 4: Hydrolyse de différents substrats chez une même souche

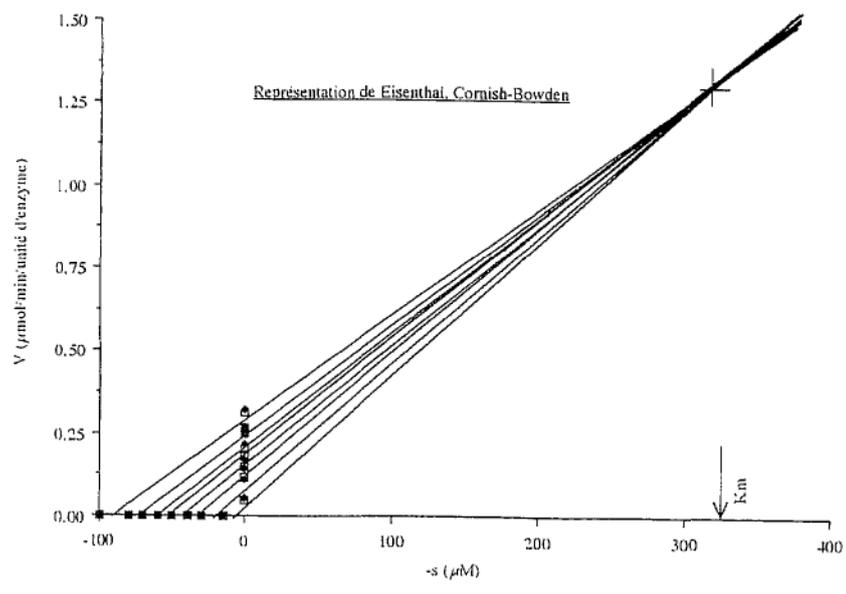
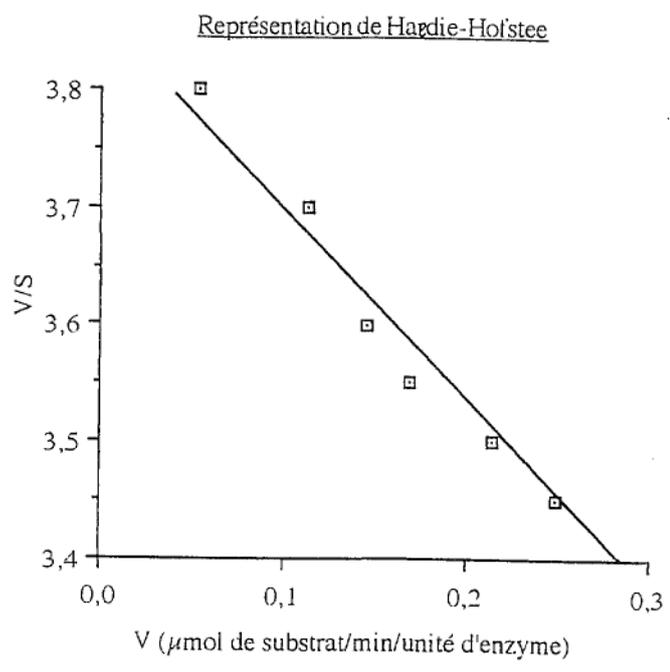
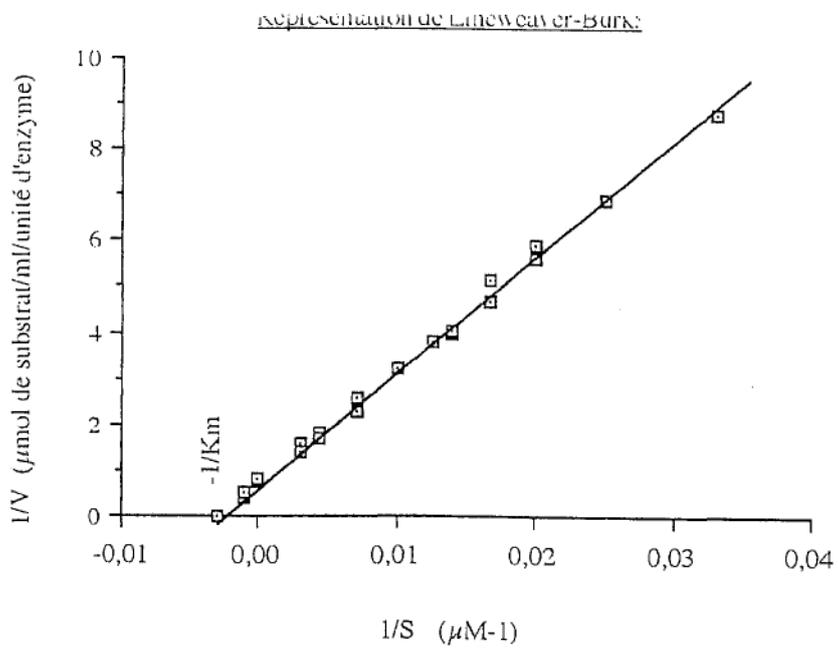


Figure 5: Traitement graphique des cinétiques obtenues pour la mesure des  $K_m$ .

# **RESULTATS**

## 1- SENSIBILITE AUX BETA-LACTAMINES

Les concentrations minimales inhibitrices sont indiquées dans le tableau X.

L'ensemble des souches présentent des CMI élevées à l'ampicilline, la pipéracilline, le céfuroxime, le céfotaxime, à l'exception de la souche 168 qui présente des CMI basses à l'ensemble des beta-lactamines. La céfoxitine reste active. L'addition à une concentration unique de 2 µg/ml d'inhibiteur de β-lactamase conduit à une réduction des CMI de 3 à 9 dilutions.

Les CMI sont relativement disparates; elles varient pour l'ampicilline de 2 à 128 selon les souches.

La souche de référence de *Bacteroides fragilis* ATCC 25 285 a présenté des CMI conformes aux valeurs décrites (Acceptal Ranges of MIC's for Control Strains Using NCCLS Reference Method, in Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual).

Souches	référence	Concentrations Minimales Inhibitrices ( $\mu\text{g/ml}$ )							
		Ampicilline	Ampicilline + Piperacilline		Céfuroxime	Cefuroxime + Céfotaxime		Céfotaxime + Céfoxitine	
			ac. clavulanic		subactam		subactam		
<i>P.bivia</i>	417	32	4	32	64	0,125	32	1	0,5
	X	4	0,062	4	8	0,062	1	0,125	1
	409	2	<0,06	2	8	0,062	1	0,062	1
	375	16	0,5	32	64	0,062	8	0,5	4
<i>P.buccae</i>	192	16	0,125	16	8	<0,06	2	0,062	4
	119	32	<0,06		4	<0,06			4
	42	8	0,125	8	4	0,062	1	<0,06	2
	408	16	<0,06	32	4	<0,06	2		4
	57	8	0,125	4	4	<0,06	1		2
	15	32	0,25	32	16	0,062	8	0,25	4
	130	32	1		16	<0,06	4		1
	75	16	0,25	32	16	0,062	2		4
	133	8	<0,06	0,25	16	0,062	2	<0,06	1
	310	32	0,125	32	32	0,125	8	0,25	4
<i>P.corporis</i>	482	4	<0,06		16	<0,06	4	0,062	1
	1232	32	1	32	32	0,062	16	2	1
<i>P.denticola</i>	126	16	0,25	0,5	32	0,25	8	0,25	0,5
<i>P.disiens</i>	391	8	<0,06	16	16	0,25	4	0,125	4
<i>P.intermedia</i>	62	16	1		8	<0,06	4	<0,06	0,5
	59	2	<0,06		8	<0,06	4	0,062	1
<i>P.loeschii</i>	178	8	<0,06	16	8	0,062	1	0,062	1
	142	16	0,5	32	16	0,062	8	0,062	2
	405	4	<0,06	8	8	0,062	4	0,062	1
	130	8	<0,06	16	32	0,062	8	0,125	4
	168	0,5	<0,06	2	4	<0,06	0,5	<0,06	0,25
<i>P.melanino.</i>	192'	16	0,5	16	32	<0,06	8	0,062	4
	139	8	<0,06	16	8	<0,06	2	<0,06	4
	117	8	0,062	8	16	0,25	4	0,25	2
	55	16	1	32	16	1	8	0,5	0,5
	391	16	0,125	16	32	<0,06	8	<0,06	0,25
	307	8	0,5		4	2	2	<0,06	0,25
<i>P.oris</i>	412	8	0,25		2	0,062	1	<0,06	1
	285	128	16	32	64	0,062	64	0,25	1
	237	4	<0,06		2	0,25	1	0,062	1
	297	32	0,5	32	8	<0,06	2	<0,06	1
<i>B.fragilis</i>	ATCC 25285	16	0,125	4	64	0,25	16	0,125	4

Tableau X : Concentrations Minimales Inhibitrices des  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des différentes souche: *Prevotella*

## 2- CROISSANCE BACTERIENNE

Pour les souches 375, 417, et 412, les résultats n'ont pas pu être exploités, soit parce que les valeurs d'Unités Formant Colonies obtenues pour les différentes dilutions étaient incohérentes entre elles, soit par suite de contamination rendant toute numération impossible.

Avec la souche X de *P.bivia*, nous avons obtenu des résultats cohérents qui nous ont permis de tracer la courbe de croissance de la figure 6. Le taux de croissance horaire obtenu est de 1 correspondant à un temps de génération de 1h, soit 3 fois plus que pour une souche de *E.Coli*. La phase exponentielle de croissance en milieu liquide paraît se situer entre 15 et 21 h. chez cette espèce.

Cependant, ces résultats doivent être pris avec une grande réserve puisqu'ils n'ont fait l'objet que d'une seule détermination, et que le principe même de la numération est sujet à une marge d'erreur importante.

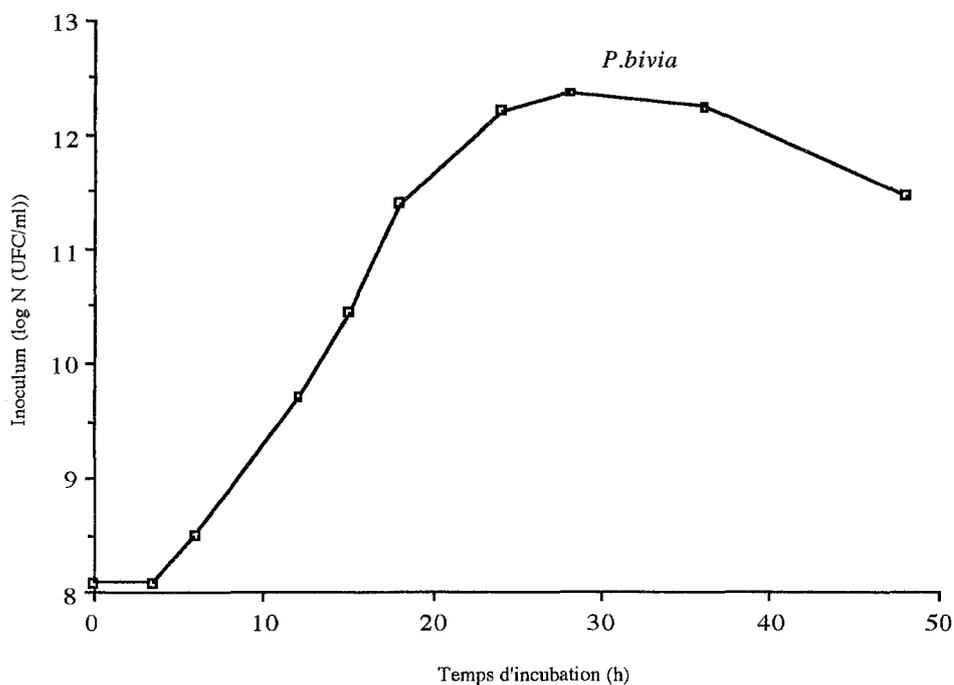


Figure 6: Courbe de croissance expérimentale obtenue chez une souche (n°41) de *Prevotella bivia*

### 3- PRODUCTION DE BETA-LACTAMASE EN FONCTION DU TEMPS

Les courbes des figures 7 et 8 expriment la production de  $\beta$ -lactamase en terme d'activité spécifique en fonction du temps, après culture en milieu gélosé solide.

Les périodes d'incubation optimales pour la récolte des colonies semblent se situer respectivement autour de:

-40 h	pour	<i>P.oris</i> (souche 412)	-60 h	pour	<i>P.melaninogenica</i> (souche55)
-42-44 h	pour	<i>P.buccae</i> (souche 75)	-60 h	pour	<i>P.loeschii</i> (souche 130)
-44-48 h	pour	<i>P.denticola</i> (souche126)	-64 h	pour	<i>P.corporis</i> (souche 1232)
-48 h	pour	<i>P.bivia</i> (souche X)	-64h	pour	<i>P.intermedia</i> (souche 62)
			-68 h	pour	<i>P.disiens</i> (souche 391)

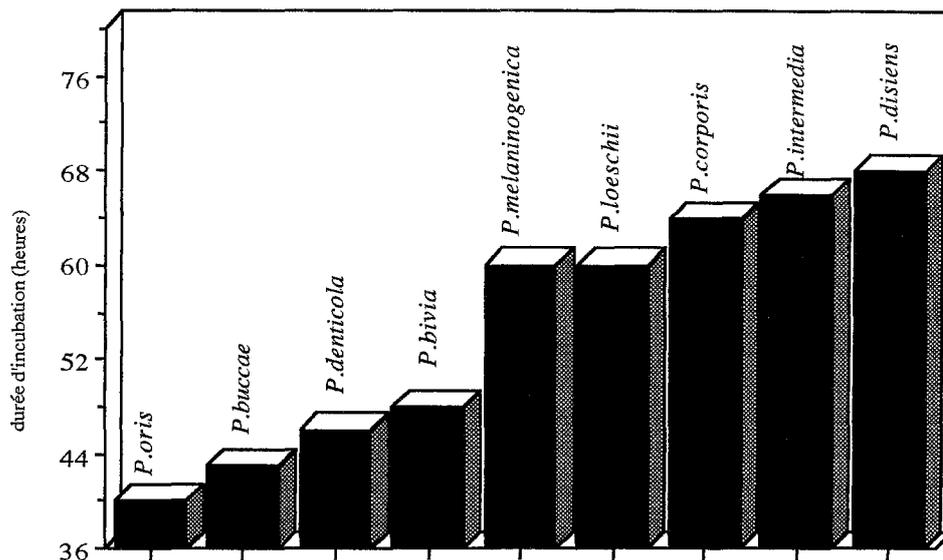


Figure 9: formation de  $\beta$ -lactamase dans le temps chez les différentes espèces.

On peut ainsi distinguer deux groupes d'espèces au sein du genre *Prevotella* :

-les espèces à croissance rapide (*P.oris*, *P.buccae*, *P.bivia*) pour lesquelles la production de  $\beta$ -lactamase serait optimale après une période d'une quarentaine d'heures de culture sur gélose au sang;

-les espèces à croissance plus lente (*P.corporis*, *P.intermedia*, *P.melaninogenica*, *P.loeschii*, *P.disiens*) pour lesquelles la production serait maximale après un délai de culture sur gélose au sang de 60 heures ou au delà.

Nous avons essayé dans la mesure du possible de respecter ces temps d'incubation dans la suite de notre travail.

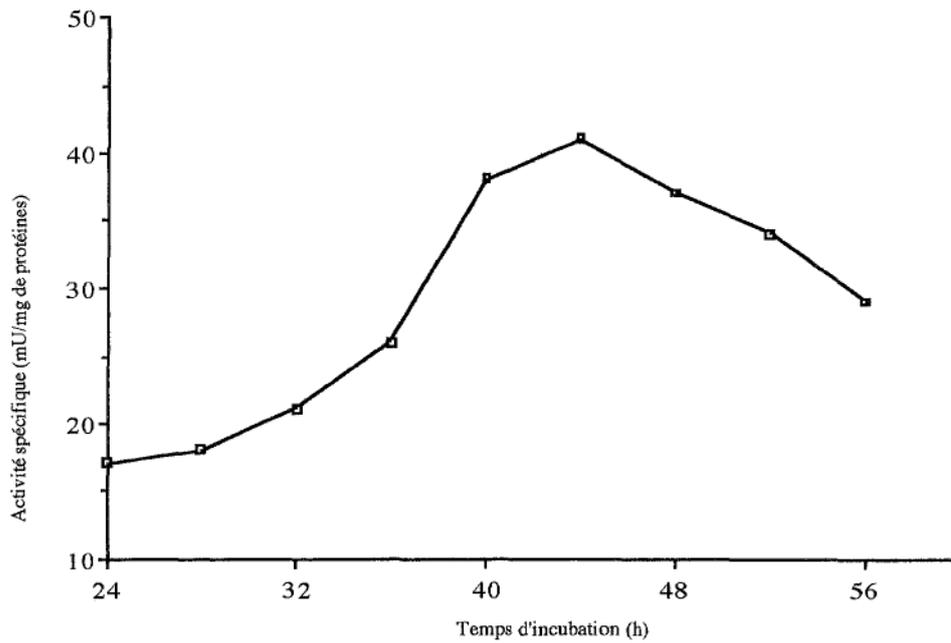


Figure 7: Formation de  $\beta$ -lactamase en fonction du temps chez une souche de *Prevotella buccae*

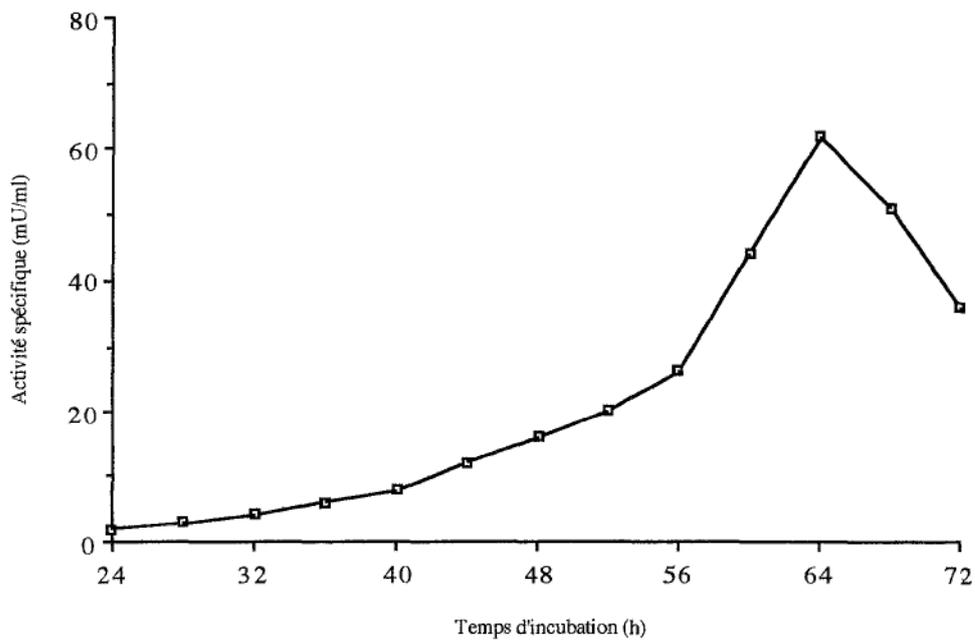


Figure 8: Formation de  $\beta$ -lactamase en fonction du temps chez une souche de *Prevotella corporis*

#### 4- ACTIVITE SPECIFIQUE ET CORRELATION AVEC LA SENSIBILITE AUX BETA-LACTAMINES

Le tableau XI indique l'activité spécifique de nos extraits. Les tableaux XII<sub>a</sub> et XII<sub>b</sub> montrent la corrélation entre CMI et activité spécifique chez 2 espèces de *Prevotella*: *P. bivia*, et *P. oris*.

Il apparaît que les valeurs d'activité semblent corrélées aux CMI à l'ampicilline et au céfuroxime. La différence entre deux souches présentant des CMI à l'ampicilline ou au céfuroxime variant d'une dilution n'est pas significative.

		Proteines (mg/ml)	Activité spécifique (mU/mg prot)	Activité (mU/ml)
<i>P. bivia</i>	4 17	1,25	42,1	52,6
<i>P. bivia</i>	3 75	0,32	47,6	15,2
<i>P. buccae</i>	1 92	1,61	37,3	60
<i>P. corporis</i>	1 232	1,27	84,3	107,1
<i>P. intermedia</i>	6 2	0,84	137,1	115,2
<i>P. loeschii</i>	1 30	0,68	27,5	18,7
<i>P. melanino.</i>	192	1,11	45,35	50,3
<i>P. melanino.</i>	3 91	0,7	94,7	66,3
<i>P. oris</i>	2 85	1,99	128	254,7

Tableau XI : Qualité des extraits obtenus

souche	CMI ( $\mu$ g/ml) des souches			
	237	412	297	285
<u><math>\beta</math>-lactamines</u>				
ampicilline	4	8	32	128
piperacilline	-	-	32	32
cefuroxime	2	2	8	64
cefotaxime	1	1	2	64
cefotixine	1	1	1	1
Activité spécifique (mU/mg de prot.)	15	18	34	128

Tableau XIIa : Corrélation entre activité spécifique et CMI chez *Prevotella oris*

souches	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ) des souches		
	X	375	417
<b><math>\beta</math>-lactamines</b>			
ampicilline	4	16	32
piperacilline	4	32	32
cefuroxime	8	64	64
cefotaxime	1	8	32
cefoxitine	1	4	0,5
<b>Activité spécifique (mU/mg de prot.)</b>	<b>17</b>	<b>47</b>	<b>42</b>

Tableau XIIIb : Correlation entre activité spécifique et CMI chez *Prevotella bivia*

## 5- POURCENTAGE D'ACTIVITE EXOCELLULAIRE

Pour quelques souches de *Prevotella bivia*, nous avons comparé l'activité enzymatique vis-à-vis de la nitrocéfine avant et après sonication: 2 aliquots étaient réalisés à partir de la suspension de départ; l'un était soniqué, l'autre pas.

Le tableau ci-dessous indique les valeurs obtenues et les pourcentages d'activité exocellulaire correspondants:

Activité	endocellulaire	exocellulaire	Pourcentage
souche 375	27,3	0,550	2 %
souche 409	29,5	0,375	1,3 %
souche 417	37,8	0,92	2,4 %

Il ressort que l'activité enzymatique est en grande partie d'origine endocellulaire.

## 6- EFFET INDUCTEUR

Nous n'avons pas mis en évidence d'effet inducteur par l'ampicilline et par la céfoxitine chez les 3 souches de *P.buccae* testées.

Le tableau ci-dessous montre les activités spécifiques des extraits obtenus après culture sur les différents milieux additionnés ou non d'antibiotique.

souche	Wilkins-Chalgreen	Wilkins-Chalgreen + ampicilline	Wilkins-Chalgreen + céfoxitine
75	15,1	9,9	11,3
15	9,8	10,3	10,5
192	28,5	22,5	14,8

## 7- PROFIL DE SUBSTRAT

Les valeurs de vitesses d'hydrolyse maximales ( $V_m$ ) et de constantes de Michaelis ( $K_m$ ) trouvées sont mentionnées dans le tableau XIII, et exprimées respectivement en micromoles d'antibiotique hydrolysé par minute et par unité d'enzyme, et en micromoles par litre. Le ratio  $V_m/K_m$  représente l' "efficacité enzymatique". Le tableau XIV exprime les mêmes données en valeurs relatives: les valeurs de  $V_m$  ainsi que celles du ratio  $V_m/K_m$  sont rapportées à celles de la céfalotine qui sont arbitrairement fixées à 100 pour le  $V_m$  et à 1 pour le ratio  $V_m/K_m$ . On observe une hydrolyse préférentielle des céphalosporines: céfuroxime, céfalotine, céfotaxime. Nous n'avons noté aucune hydrolyse avec la céfoxitine. Ceci confirme les valeurs de CMI basses trouvées avec cet antibiotique.

Concernant les pénicillines, nous avons observé une réelle hydrolyse avec le substrat ampicilline, mais particulièrement lente: la réaction n'est totale qu'après plusieurs heures de contact enzyme-substrat. Un témoin ampicilline seule a permis d'objectiver ce résultat. Ceci ne nous a pas permis de mesurer correctement les valeurs de  $K_m$ . Ces valeurs semblent cependant beaucoup plus élevées que celles trouvées avec les céphalosporines, d'après nos essais. Elles seraient supérieures à 1000  $\mu M$  dans tous les cas.

		Ampicilline		Céfalotine			Céfuroxime				Céfotaxime			
		Vi	Vi	Vm	Km	Vm/Km	Vi	Vm	Km	Vm/Km	Vi	Vm	Km	Vm/Km
<i>P. bivia</i>	417	0,0735	0,165	0,421	155	2,72	0,322	0,792	146	5,42	0,09	0,398	342	1,16
<i>P. bivia</i>	375	0,193	0,208	0,416	100	4,16	0,216	0,421	95	4,43	0,095	0,384	304	1,26
<i>P. buccae</i>	192	0,0515	0,183	0,64	250	2,56	0,22	0,464	111	4,18	0,079	0,336	326	1,03
<i>P. corporis</i>	1232	0	0,126	0,404	221	1,83	0,132	0,352	167	2,11	0,046	0,137	198	0,69
<i>P. intermedia</i>	62	ND	0,12	0,443	269	1,65	0,161	0,354	120	2,95	0,073	0,31	325	0,95
<i>P. loeschii</i>	130	ND	0,156	0,435	179	2,43	0,27	0,958	255	3,75	0,09	0,427	375	1,14
<i>P. melaninogenica</i>	192'	0	0,158	0,561	255	2,2	0,239	1,073	350	3,06	0,065	0,247	280	0,88
<i>P. melaninogenica</i>	391	0,03	0,107	0,26	143	1,82	0,214	0,92	330	2,79	0,055	0,248	351	0,71
<i>P. oris</i>	285	0,0276	0,136	0,238	75	3,17	0,126	0,202	60	3,36	0,103	0,405	294	1,38

Tableau XIII : Valeurs de Vm et Km des souches étudiées.

Vm (μmol/min/unité d'enzyme)  
 Km (μM)  
 Vi (μmol/min/unité d'enzyme)  
 Vm/Km (ml/min/unité d'enzyme)

	<u>Céfalotine</u>		<u>Céfuroxime</u>		<u>Céfotaxime</u>	
	Vm*	Vm/Km*	Vm	Vm/Km	Vm	Vm/Km
<u><i>P.bivia</i></u>						
417	100	1	188	1,99	94,5	0,43
375	100	1	101	1,06	92,3	0,3
<u><i>P.buccae</i></u>						
192	100	1	72,5	1,63	52,5	0,4
<u><i>P.corporis</i></u>						
123 2	100	1	87,1	1,15	33,9	0,38
<u><i>P.intermedia</i></u>						
62	100	1	79,9	1,79	70	0,57
<u><i>P.loeschii</i></u>						
130	100	1	220	1,54	98	0,47
<u><i>P.melaninogenica</i></u>						
192'	100	1	191	1,39	44	0,4
391	100	1	353	1,53	95,4	0,39
<u><i>P.oris</i></u>						
285	100	1	84,8	1,06	170	0,43

\* Relatifs par rapport à la céfalotine

Tableau XIV: Valeurs relatives de Vm et Km

Strain	Cephaloridine $K_m^b$	Cephalothin		Cefamandole		Cefotaxime <sup>a</sup>		Nitrocefin		Cefuroxime hydrolysis rate <sup>c</sup>
		$V_{max}^d$	$K_m$	$V_{max}$	$K_m$	$V_{max}$	$K_m$	$V_{max}$	$K_m$	
<i>B. melaninogenicus</i>										
184	41	67	36	25	17	76	34	668	29	86
192	26	96	85	24	23	58	46	216	8	24
<i>B. loescheii</i> 201	62	826	143	158	53	110	41	208	10	98
<i>B. intermedius</i>										
820	12	65	8	66	47	145	84	112	4	56
837	62	116	66	41	170	58	13	352	39	69
<i>B. oralis</i> 182	26	55	8	33	41	26	48	216	6	50
<i>B. bivius</i>										
198	70	55	55	13	35	46	90	514	59	60
690	29	31	11	31	39	66	78	108	8	45
691	49	25	14	19	59	40	127	92	9	29
<i>B. disiens</i>										
802	40	36	32	20	66	35	84	85	11	19
867	70	33	138	28	46	28	98	415	12	62
<i>B. capillosus</i> 902	25	45	30	28	42	<0.1 <sup>e</sup>		105	3	74

<sup>a</sup> No detectable hydrolysis of cefoxitin or moxalactam (relative  $V_{max}$ , <0.1).

<sup>b</sup> Micromolar.

<sup>c</sup> No  $K_m$  done. Hydrolysis rate of 100  $\mu$ M cefuroxime, compared with that of 100  $\mu$ M cephaloridine, taken as 100% hydrolysis.

<sup>d</sup> Relative to cephaloridine (100%).

<sup>e</sup> Cefotaxime MIC = 64  $\mu$ g/ml; apparent  $K_i$  of cefotaxime  $\geq$ 100  $\mu$ M.

TABLE 4. Penicillinase activity of  $\beta$ -lactamases from *Bacteroides* spp.<sup>a</sup>

Strain	Relative $V_{max}$			
	Benzyl- penicillin G	Cloxa- cillin	Amoxi- cillin	Mezlo- cillin
<i>B. melaninogenicus</i>				
184	4	4	2	4
192	2	1	ND <sup>b</sup>	1
<i>B. loescheii</i> 201	11	0	2	6
<i>B. intermedius</i>				
820	12	ND	13	20
837	10	ND	ND	ND
<i>B. oralis</i> 182	7	0	6	9
<i>B. bivius</i>				
198	3	1	1	2
690	4	4	4	3
691	2	2	1	2
<i>B. disiens</i>				
802	2	2	1	3
867	2	0.3	0.3	2
<i>B. capillosus</i> 902	11	ND	12	ND

<sup>a</sup> Microacidimetric method. Values expressed as a percentage of the value of cephaloridine (100%).

<sup>b</sup> ND, Not done.

	céfalotine		céfamandole		céfuroxime		céfotaxime		nitrocéfine	
	Vm	Vm/Km	Vm	Vm/Km	Vm	Vm/Km	Vm	Vm/Km	Vm	Vm/Km
<b><u>P.bivia</u></b>										
198	100	1	24	0,4	109	*	84	0,5	934	8,7
690	100	1	100	0,3	145	*	213	0,3	348	4,8
691	100	1	76	0,3	116	*	160	0,2	368	5,7
<b><u>P.disiens</u></b>										
802	100	1	55	0,3	53	*	97	0,4	236	7
867	100	1	85	2,5	188	*	85	1,2	1257	144
<b><u>P.intermedia</u></b>										
820	100	1	101	0,2	86	*	223	0,2	172	3,45
837	100	1	35	0,1	59	*	50	2,5	303	5,15
<b><u>P.loeschii</u></b>										
201	100	1	19	0,5	12	*	13	0,5	25	4
<b><u>P.melaninogenica</u></b>										
184	100	1	37	0,8	128	*	113	1,2	997	12
192	100	1	25	0,95	25	*	60	1,1	225	24,5
<b><u>P.oralis</u></b>										
182	100	1	60	0,1	91	*	47	0,08	393	5,3

\* les Km ne sont pas donnés pour le céfuroxime

Annexe1 (suite) : Valeurs relatives de Vm et Vm/Km, d'après Appelbaum (5).

# **DISCUSSION**

## 1-Choix des souches

Peu d'auteurs ont étudié la beta-lactamase des *Prevotella*, en regard du nombre élevé d'études portant sur celles des *Bacteroides* du groupe *fragilis*. Lacroix et Lamothe ont étudié spécifiquement la  $\beta$ -lactamase de l'espèce *Prevotella bivia*, mais le travail d'Appelbaum est le plus complet en la matière à l'heure actuelle. C'est pourquoi nous y faisons largement référence.

Notre travail porte sur un nombre plus restreint de souches. Certaines de ces souches appartiennent à des espèces pour lesquelles le profil de substrat n'a jamais été décrit à notre connaissance (*Prevotella buccae*, *P.oris*, *P.corporis*). Nous n'avons pas testé de souche de *P.oralis*, alors que cette espèce sécrète fréquemment l'enzyme.

Les neuf souches que nous avons testées ont un niveau de résistance un peu moins élevé que celles étudiées par l'équipe d'Appelbaum. Les critères d'inclusion retenus étaient, outre la présence de la beta-lactamase, une CMI à l'ampicilline supérieure ou égale à 4 à l'épsilon-mètre.

Ce niveau de résistance semble corrélé au niveau d'expression de la  $\beta$ -lactamase exprimée en terme d'activité spécifique (voir tab.XIIa et XIIb). Ceci permet d'une part de considérer la technique de préparation des extraits comme valide, et d'autre part d'écarter l'hypothèse d'un autre mécanisme de résistance.

Toutes nos souches ont été isolées de prélèvements pathologiques dans le cadre notamment de salpingites, péritonites, ostéites, sinusites ou infections respiratoires basses. Ceci est conforme au rôle pathogène occasionnel décrit chez ces espèces.

## 2-Concentrations Minimales Inhibitrices et phénotype de résistance

Le phénotype de résistance aux beta-lactamines a été précisé par L.Dubreuil (30): « les souches non productrices de beta-lactamase sont sensibles à toutes les  $\beta$ -lactamines (sauf l'aztréonam). La production d'une  $\beta$ -lactamase rend inactifs le céfamandole, le céfuroxime, et les aminopénicillines. On observe simultanément une élévation des CMI du céfotaxime, de la pipéracilline et de la ticarcilline qui demeurent le plus souvent actifs sur ces souches. »

Il faut signaler que les concentrations critiques ne sont pas définies pour les *Prevotella*. Il n'est pas possible d'établir pour les bactéries anaérobies une courbe de concordance comme c'est le cas pour les bactéries aérobies. Ceci est un réel problème. Les valeurs mentionnées par le NCCLS ne font pas l'objet d'un consensus général à l'heure actuelle. A titre indicatif, une souche dont la CMI à l'amoxicilline est supérieure ou égale à 4  $\mu\text{g/ml}$  est considérée comme résistante; une souche dont la CMI à l'amoxicilline est inférieure ou égale à 0,5  $\mu\text{g/ml}$  est considérée comme sensible (L.Dubreuil, A.Sédallian).

### 3-Production de $\beta$ -lactamase et croissance bactérienne

Dans de nombreuses études portant sur les  $\beta$ -lactamase bactériennes, les bactéries sont cultivées en milieu liquide. Cette option offre de nombreux avantages:

- une plus grande rapidité
- une grande reproductibilité
- la cinétique de la croissance est le plus souvent bien connue; la période optimale pour la récolte des corps bactériens se situe à la fin de la phase exponentielle de croissance, et éventuellement au début de la phase stationnaire.

L'inconvénient majeur de ce type de culture est le risque de contamination. Ce risque est particulièrement aigu lorsqu'il s'agit de bactéries anaérobies. Pour éviter cet écueil, nous avons choisi la culture en milieu gélosé qui permet à tout instant de s'assurer de l'absence de contamination.

Le premier problème lié à la culture en milieu solide est l'obtention d'enzyme en grande quantité. L'absence d'induction ne permet pas d'augmenter artificiellement la production d'enzyme par addition de pénicilline ou de céfoxitine.

Le second problème lié à la culture en milieu solide est de connaître la cinétique de croissance et la période d'incubation adéquate pour la récolte des colonies bactériennes.

C'est avec ce souci que nous avons entamé notre travail par l'étude de la cinétique de production de  $\beta$ -lactamase dans le temps. Les variations des taux d'activité spécifique observées en fonction de la durée d'incubation nous ont permis de définir pour chaque souche étudiée une période d'incubation optimale. L'analyse des résultats obtenus montre a priori qu'une période d'incubation de 48 heures:

- est optimale dans le groupe (*P. oris*, *P. buccae*, *P. bivia*, *P. denticola*).
- n'est pas optimale dans le groupe (*P. loeschii*, *P. melaninogenica*, *P. disiens*, *P. intermedia*, *P. corporis*).

Ces résultats demandent à être confirmés en s'appuyant sur l'étude de plusieurs souches par espèces.

Cela dit, la différence observée entre les deux groupes nous semble conforme à la cinétique de la croissance telle que l'on peut l'observer sur gélose au sang: les espèces du premier groupe développent des colonies de taille satisfaisante ( $\geq 0,5$  mm de diamètre) en 48 heures, tandis que les espèces appartenant au deuxième groupe ne forment des colonies bien visibles qu'après 3 ou 4 jours de culture.

Nous avons essayé de respecter ces temps d'incubation dans la partie préparative de notre travail afin d'optimiser la production d'enzyme. Pourtant, il nous semble avec le recul qu'une période d'incubation de 48 heures est mieux justifiée pour ce type d'étude, et ceci pour deux raisons:

#### (1)-pour une meilleure reproductibilité

Cette reproductibilité nous a certainement fait défaut lors de nos préparations. Nous avons observé des différences significatives d'activité spécifique entre différentes séries d'extraits au sein d'une même souche, et nous avons dû en tenir compte dans nos calculs.

#### (2)-pour une meilleure corrélation avec les CMI

La durée d'incubation utilisée lors de la détermination des CMI est de 48 heures. Cette période est fixe pour toutes les souches, puisque toutes les souches sont ensemencées automatiquement sur une même boîte gélosée. La lisibilité à 48 h. ne pose pas de problème; ceci permet de considérer que l'activité  $\beta$ -lactamase est suffisante, même si elle n'est pas optimale, pour dégrader efficacement les  $\beta$ -lactamines du milieu. Dans le cadre de notre étude comparative entre activité spécifique et CMI ( tab.XIIa et XIIb), les deux espèces testées étaient *P.oris* et *P.bivia*. Pour chacune de ces espèces, la durée d'incubation a été de 48 heures, ce qui valide l'expérience.

La cinétique de croissance en milieu liquide n'étant pas décrite chez les *Prevotella*, nous avons essayé également de la définir à partir de quelques espèces cultivées en bouillon Rosenow. Cet essai n'a pas été très concluant; la courbe obtenue permet tout au plus de se faire une idée sur la question.

### **4.Extraction des beta-lactamases**

Les résultats de la cinétique enzymatique sont fortement conditionnés par toute la partie préparative. Il est important que la technique d'extraction soit le plus reproductible possible. Mais la culture en milieu solide ne permet pas une bonne reproductibilité. En effet, lors de l'ensemencement des boîtes à la pipette Pasteur, l'inoculum n'est pas calibré. Il est donc nécessaire de considérer chaque série d'extrait individuellement.

Appelbaum et coll. ont également utilisé une préparation avec culture en milieu solide, tandis que Lacroix et Lamothe ont cultivé leurs souches de *Prevotella bivia* en milieu liquide. La préparation simple que nous avons utilisée est assez proche de celle employée par Appelbaum et son équipe, en dehors du fait que:

(1)-l'éclatement des corps bactériens est obtenu par agitation à l'aide de billes de verre, et non par sonication. Il n'a pas été mis en évidence de bénéfice d'une technique par rapport à une autre (101); nous pensons que les procédés sont aussi performants.

(2)-la centrifugation finale est différente: nous avons centrifugé nos lysats bactériens sous une accélération de 39 550 g soit 25.000 rpm. Les accélérations utilisées par Appelbaum, et par Lacroix & Lamothe sont respectivement 25.000 g et 30.000 g

Précisons enfin que ces différents auteurs ont travaillé comme nous sur des extraits bruts. Aucun travail sur une  $\beta$ -lactamase de *Prevotella* purifiée n'a encore donné lieu à publication. On peut s'interroger sur la valeur de la détermination des constantes

cinétiques  $V_m$  et  $K_m$  à partir de préparations non purifiées comparativement à des valeurs obtenues à partir d'enzymes purifiées. Pour notre part, nous pensons que de tels résultats doivent être considérés comme n'ayant qu'une valeur indicative, qui doit suffire néanmoins à définir le profil de substrat, mais qu'ils ne peuvent être comparés directement à des valeurs obtenues à partir de préparations enzymatiques purifiées. Les activités spécifiques des extraits doivent être pris en compte si l'on veut comparer ces données. Celles de nos extraits (tab XI) sont comparables à celles des extraits de l'étude d'Appelbaum (35-140 versus 7-190 mU/mg de protéines).

### **5-Profil de substrat**

L'analyse du profil de substrat est un élément fondamental de l'étude des  $\beta$ -lactamases en vue d'une classification. A terme, la connaissance de ce profil pourrait permettre une meilleure interprétation de l'antibiogramme chez ces espèces. Les différents profils individualisés permettent en effet de définir schématiquement des types enzymatiques où le terme de céphalosporinase définit une hydrolyse préférentielle des céphalosporines sans exclure celle des pénicillines.

Dans sa publication de 1989 sur la caractérisation des  $\beta$ -lactamases, K. Bush explique clairement l'importance qu'il y a à connaître l'ensemble des données suivantes:  $V_m$ ,  $K_m$ , quantité d'enzyme, activité spécifique. L'usage des valeurs relatives de taux d'hydrolyse ( $V_m$ ) ou de ratios  $V_m/K_m$  offre un abord pratique en permettant des comparaisons intersouches. Le substrat de référence généralement mentionné est la céfaloridine ou la nitrocéfine.

Nous avons exprimé nos résultats en valeurs brutes et en valeurs relatives. Notre substrat de référence est la céfalotine. La détermination des  $K_m$  pour l'ampicilline n'a pas été possible du fait de l'hydrolyse très lente de ce substrat et de l'activité relativement faible de nos extraits. Les valeurs de  $K_m$  que nous trouvons vis-à-vis des céphalosporines sont sensiblement plus élevées que celles d'Appelbaum (60-330  $\mu M$  versus 10-150  $\mu M$ ). Les valeurs d'activité spécifiques sont comparables, mais les prises d'essai d'enzyme sont probablement différentes (elles ne sont pas précisées dans l'étude Appelbaum).

Concernant nos résultats, la comparaison des valeurs brutes de  $V_m$  et  $K_m$  ne peut s'opérer qu'au sein d'une même souche, vis-à-vis des différents antibiotiques. Les prises d'essai d'enzyme ont en effet été ajustées pour chaque souche; elles ont pu varier entre 5 et 15 mU selon les cas. Il est donc plus juste de comparer les valeurs relatives. Appelbaum indique que ses valeurs de  $K_m$  sont parfois sensiblement différentes entre souches d'une même espèce. L'examen des ratios  $V_m/K_m$  exprimés en valeurs relatives par rapport à la céfalotine montre que nos résultats semblent plus cohérents.

Quoi qu'il en soit, l'analyse de nos résultats indique clairement la nature de la  $\beta$ -lactamase: il s'agit d'une céphalosporinase. Cette enzyme pourrait être classée dans le

groupe 2e de la classification de Bush, car elle paraît hydrolyser préférentiellement les céphalosporines de deuxième génération (céfuroxime) - exception faite des céphamycines - et est inhibée par l'acide clavulanique. L'hydrolyse des pénicillines décrite habituellement est plus difficile à mettre en évidence: nous avons mesuré des variations faibles de la densité optique sur une durée de deux heures en présence du substrat ampicilline chez 5 souches - ceci témoigne d'une hydrolyse lente - et aucune variation de densité optique chez 3 autres souches. Pourtant, toutes les souches testées ont présenté des CMI à l'ampicilline variant entre 8 et 128  $\mu\text{g/ml}$ . A ce sujet, certains auteurs ont signalé chez *Bacteroides fragilis* qu'un effet-dose pouvait limiter la détection d'hydrolyse au spectrophotomètre: lorsque l'activité spécifique est inférieure à 0,1 U (cas de nos extraits), une hydrolyse des seules céphalosporines serait observée; lorsque cette activité est supérieure à 0,1 unité, l'hydrolyse des pénicillines serait également mesurable (30). Par ailleurs, il convient de signaler que la plupart du temps, l'hydrolyse des pénicillines décrite dans la littérature est mesurée par une technique microacidimétrique et non par spectrophotométrie.

Au vu des CMI, l'ampicilline apparaît tout de même comme un mauvais substrat, mais c'est en revanche un bon marqueur de l'antibiogramme.

# CONCLUSION

## Conclusion et perspectives

---

L'objectif de notre travail était d'évaluer le profil de substrat de la  $\beta$ -lactamase produite par différentes espèces de *Prevotella*, en déterminant les constantes cinétiques  $V_m$  et  $K_m$  pour chaque souche vis-à-vis de quelques beta-lactamines.

Après culture en milieu solide et sous anaérobiose stricte, l'enzyme est extraite par sonication et centrifugation. Les surnageants sont utilisés comme extraits bruts.

Pour chaque extrait, l'activité spécifique est mesurée à l'aide d'une beta-lactamine chromogène: la nitrocéfine. Les valeurs d'activité spécifique sont globalement corrélées aux Concentrations Minimales Inhibitrices, mais elles dépendent également des conditions de culture: l'inoculum, et la durée d'incubation.

Parmi 35 souches de *Prevotella* productrices d'enzyme, nous avons sélectionné 9 souches présentant des Concentrations Minimales Inhibitrices relativement élevées, et dont les extraits présentaient une valeur d'activité spécifique supérieure à 25 mU/mg de protéines.

Pour chacune de ces souches, nous avons suivi l'hydrolyse de différents substrats par les extraits enzymatiques par une mesure spectrophotométrique directe, et calculé les valeurs de vitesse maximale d'hydrolyse ( $V_m$ ) et de constante de Michaëlis ( $K_m$ ) à partir de l'équation de Michaelis-Menten.

Les valeurs relatives des ratios  $V_m/K_m$  par rapport à la céfalotine permettent de comparer le profil des différentes souches. L'ensemble des souches étudiées présentent le même profil: les céphalosporines sont préférentiellement hydrolysées à l'ampicilline. Parmi les céphalosporines testées, le céfuroxime présente le meilleur potentiel d'hydrolyse, suivi de la céfalotine, et du céfotaxime. L'ampicilline est hydrolysée beaucoup plus lentement; la détermination des constantes de Michaëlis n'a pas été possible avec ce substrat.

La nature de la beta-lactamase peut donc être affirmée: il s'agit d'une céphalosporinase, mais qui est également capable d'hydrolyser lentement les aminopénicillines.

Les perspectives de ce travail pourraient être les suivantes:

-étendre le profil à d'autres beta-lactamines telles que la pénicilline G et la pipéracilline. Ceci suppose de résoudre le problème technique lié à la détection de l'hydrolyse des pénicillines par spectrophotométrie dans l'ultraviolet, en améliorant la qualité des extraits.

-tester dans les mêmes conditions une ou des enzymes de référence dont les constantes cinétiques sont connues, et apprécier de façon plus rigoureuse la reproductibilité de la mesure des  $K_m$ .

-enfin la détermination des points isoélectriques complèterait utilement ce travail. Nous conservons des extraits de nos souches dans cette optique.

# **BIBLIOGRAPHIE**

1. ABRAHAM E.P., S.G. WALEY

Beta-lactamases from *Bacillus cereus*  
In J.M. Hamilton and J.T. Smith (ed), Beta-lactamases .  
Academic Press Inc.(London), 1979, Ltd, London.

2. ALDRIDGE K., C.V. SANDERS, A.C. LEWIS

Susceptibility of anaerobic bacteria to  $\beta$  lactam antibiotics and  $\beta$ -lactamase production.  
J.Med.Microbiol., 1983, 16: 75-82.

3. AMBLER R.P.

The structure of  $\beta$  lactamases .  
Philos.Trans.R.Soc.London.B.Biol.Sci., 1980, 289: 321-331.

4. ANDERSON J.D., R.B. SYKES

Characterization of beta-lactamase obtained from a strain of *Bacteroides fragilis* resistant to beta-lactam antibiotics.  
J.Med.Microbiol., 1973, 6: 201-206.

5. APPELBAUM P.C., A. PHILIPPON, M.R. JACOBS

Characterization of  $\beta$  lactamases from non-*Bacteroides fragilis* group *Bacteroides* spp. Belonging to seven species and their role in  $\beta$ -lactam resistance.  
Antimicrob.Agents Chemother., 1990, 34: 2169-2170.

6. APPELBAUM P.C., S.K. SPANGLER, M.R. JACOBS

Evaluation of two methods for rapid testing for beta lactamase production in *Bacteroides* and *Fusobacterium*.  
Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis., 1990, 9: 47-50.

7. APPELBAUM P.C., S.K. SPANGLER, M.R. JACOBS

Susceptibilities of 394 *Bacteroides fragilis*, Non-*Bacteroides fragilis* group, *Bacteroides* species, and *Fusobacterium* species to newer antimicrobial agents.  
Antimicrob.Agents Chemother., 1991, 35: 1214-1218.

8. APPELBAUM P.C., S.K. SPANGLER, R. SHIMAN

Susceptibilities of 540 anaerobic gram negative bacilli to amoxicillin, amoxicillin-BRL 42 715, amoxicillin-clavulanate, temafloxacin, and clindamycin.  
Antimicrob.Agents Chemother., 1992, 36: 1140-1143.

9. APPELBAUM P.C., S.K. SPANGLER, G.A. PANKUCH, A. PHILIPPON

Characterization of  $\beta$  lactamase from *Clostridium clostridiforme*.  
J.Antimicrobial.Chemother., 1994, 33: 33-40.

10. BANDO K., Y. MUTO, K. WATANABE

Biochemical properties and purification of metallo- $\beta$ -lactamase from *Bacteroides fragilis*.  
Antimicrob.Agents Chemother., 1991, 35: 371-372.

11. BERGEY'S Manual of Systematic Bacteriology,  
volume 1, 1984, Williams and Wilkin's Ed.
12. BLANDINO G., B. OLSSON, C.E. NORD  
Characterisation of beta-lactamases from *Clostridium butyricum*.  
Chemotherapia, 1983, 2: 95-96.
- 12'. BOUCHET A.  
Etude des acides gras de paroi de *Bacteroides oralis-melaninogenicus* est espèces  
apprentées par chromatographie gaz-liquide.  
Thèse de doctorat en pharmacie, 1988.
13. BOURGAULT A.M., J.E. ROSENBLATT  
Characterisation of anaerobic gram negative bacilli by using rapid slide test for  
 $\beta$ -lactamase production.  
J.Clin.Antimicrobiol., 1979, 9: 654-656.
14. BRADFORD M.M.  
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of  
protein utilizing the principle of protein-dye binding.  
Analytical Biochemistry, 1974, 63: 17-26.
15. BREUIL J., L. PODGLAJEN, E. COLLATZ  
Sélection *in vitro* de *Bacteroides fragilis* résistant à l'imipénèm (ImpR).  
Résistance à haut niveau par production de  $\beta$ -lactamase.  
Méd.Mal.Inf., 1990, 20 (hors série): 131-134.
16. BRITZ M.L., G. RUSSEL, G. WILKINSON  
Purification and properties of beta-lactamase from *Bacteroides fragilis*.  
Antimicrob.Agents Chemother., 1978, 13: 373-382.
17. BROWN M.J.  
National Comitee for Clinical Laboratory Standards agar dilution suseptibility  
testing for anaerobic gram-negative bacteria.  
Antimicrob.Agents Chemother., 1988, 32: 385-390.
18. BUSH K., R.B. SYKES  
 $\beta$ -lactam inhibitors of  $\beta$ -lactamse in perspective.  
J.Antimicrob.Chemother., 1983, 11: 97-107.
19. BUSH K., R.B. SYKES  
Methodology for the study of  $\beta$ -lactamases.  
Antimicrob.Agents Chemother., 1986, 30: 6-10.

21.BUSH K.

Classification of  $\beta$  lactamases: groups 1, 2a, 2b and 2b'.  
Antimicrob.Agents Chemother., 1989, 33: 264-270.

22.BUSH K.

Classification of  $\beta$  lactamases: groups 2c, 2d, 2e,3 and 4.  
Antimicrob.Agents Chemother., 1989, 33: 271-276.

22bis.BUSH K., G.E. JACOBY, A.A. MEDEIROS

A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with  
molecular structure.  
Antimicrob.Agents Chemother., 1995, 39: 1211-1233.

23.CUCHURAL G.J., F.P.TALLY, N.V. JACOBUS

Cefoxitin inactivation by *Bacteroides fragilis*.  
Antimicrob.Agents Chemother., 1983, 24: 916-940.

24.CUCHURAL G.J., M.H. MALAMY, F.P. TALLY

Beta-lactamase-mediated-imipenem resistance in *Bacteroides fragilis*.  
Antimicrob.Agents Chemother., 1986, 30: 645-648.

25.CUCHURAL G.J., F.P.TALLY, J.R. STOREY

Transfer of  $\beta$ -lactamase-associated cefoxitin resistance in *Bacteroides fragilis*.  
Antimicrob.Agents Chemother., 1986, 29: 918-920.

26.DARLAND G., J. BIRNBAUM

Cefoxitin resistance to  $\beta$  lactamase a major factor for susceptibility of  
*Bacteroides fragilis* to the antibiotics.  
Antimicrob.Agents Chemother., 1977, 11: 725-734.

26 bis.DAVID M. LIVEMORE

Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance  
Clinical Microbiol.reviews, 1995, 8 (n°4): 557-584.

27. DEL BENE V.E., W.E. FARRAR

Cephalosporinase activity in *Bacteroides fragilis*.  
Antimicrob.Agents Chemother., 1973, 3: 369-372.

28.DORNBUSH K., B. OLSSON-NORD

Antimicrobial activity of new  $\beta$  lactam antibiotics on cefoxitin resistant strains  
of *Bacteroides fragilis*.  
J.Antimicrob.Chemother., 1980, 6: 207-216.

- 29.DUBREUIL L., J. BREUIL, A. DUBLANCHET
- Survey of the susceptibility patterns of *Bacteroides fragilis* group strains in France from 1977 to 1992.  
Eur.J;Clin.Microbiol.Infect.dis., 1992, 11: 1094-1099.
- 30.DUBREUIL L.
- Beta-lactamase des anaérobies strictes: intérêt médical.  
La lettre de l'infectiologue, 1995, Tome X n°3: 64-76.
- 31.DUBREUIL L.
- L'antibiogramme des bactéries anaérobies strictes.  
Revue française des Laboratoires, 1995, N° 227.
- 32.EDEBO L.
- A new press for the disruption of microorganisms and other cells.  
J.Biochem.Microbiol.Technol.Enz., 1980, 2: 453-479.
- 33.ELEY A., D. GEENWOOD
- Characterization of  $\beta$ -lactamases in clinical isolates of *Bacteroides*.  
J.Antimicrob.Chemother., 1986, 18: 325-333.
- 34.ERIQUEZ L.A., R.F. D'AMATO
- Purification by affinity chromatography and properties of a beta-lactamase isolated from *Neisseria gonorrhoeae*.  
Antimicrob.Agents Chemother., 1979, 15: 229-234.
- 35.GABEY E.L., V.L. SUTTER, S.M. FINEGOLD
- Rapid  $\beta$  lactamase testing in *Bacteroides*.  
J.Antimicrob.Chemother., 1981, 8: 413-416.
- 36.GARROD L.P.
- Sensitivity of four species of *Bacteroides* to antibiotics.  
Brit.Med.J., 1955, 1529-1531.
- 37.GROLLIER G., F. GUILLOT, Y. DERAUTLIN DE LA ROY
- A penicillinase producing *Fusobacterium nucleatum* strain isolated from blood culture.  
Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis., 1987, 6: 695.
- 38.HART C.A., K. BARR, T. MAKIN
- Characteristics of  $\beta$ -lactamase produced by *Clostridium butyricum*.  
Chemotherapy, 1983, 2: 95-96.
- 39.HEDBERG M., L. LINDQVIST, K. TUNER
- Effect of beta-lactamase inhibitors on beta-lactamases from anaerobic bacteria.  
Anal.Biochem., 1988, 168: 252-258.

40.HEDBERG M., C. EDLUNG, L. LINDQVIST

Purification and characterization of an imipenem hydrolysing metallo- $\beta$ -lactamase from *Bacteroides fragilis*.  
J.Antimicrob.Chemother., 1992, 29: 105-113.

41.HEDBERG M., L. LINDQVIST, T. BERGMAN

Purification and characterization of a new  $\beta$ -lactamase from *Bacteroides uniformis*  
Antimicrob.Agents.Chemother., 1995, 39: 1458-1461.

41 bis. HIRTZ P.

Isoélectrofocalisation des  $\beta$ -lactamases de *Serratia marcescens* ; application à l'épidémiologie.  
Mémoire du diplôme d'Etudes Spécialisées de biologie médicale, 1988.

42.HOU J.P., J.W. POOLE

Measurement of  $\beta$ -lactamase activity and rate of inactivation of penicillins by a pH-stat alkalimetric titration method.  
J.Pharm.Sci.,1972, 61: 1594-1598.

43.HURLBUT S., G.J. CUCHURAL, F.P. TALLY

Imipenem resistance in *Bacteroides uniformis* mediated by a novel beta-lactamase.  
Antimicrob.Agents.Chemother., 1990, 34: 117-120.

44.INTERNATIONAL Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on gram-negative anaerobic; rods meeting on September 13-14, 1990.

45.JACOBS M.R., S;K; SPANGLER, P.C. APPELBAUM

Susceptibility of *Bacteroides non fragilis* and *Fusobacterium* to amoxicillin, amoxicillin-clavulanate, ticarcillin, ticarcillin-clavulanate, cefoxitin, imipenem and metronidazole.  
Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis., 1990, 9: 417-421.

46.JACOBS M.R., S;K; SPANGLER, P.C. APPELBAUM

Beta-lactamase production and susceptibility of US and European anaerobic gram-negative bacilli to beta-lactams and other agents.  
Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis., 1992, 11: 1081-1093.

47.KAZMIERCZAK A., A. PHILIPPON, H. CHARDON

Constantes enzymatiques (Km et Vmax) des  $\beta$  lactamases mesurées par une méthode micro-acidimétrique couplée à l'ordinateur.  
Ann.Microbiol.(Inst.Past.), 1973, 124 B (n°3): 259-268.

48.KESADO T., L. LINDQVIST, M. HEDBERG

Purification and properties of a new  $\beta$ -lactamase from *Clostridium butyricum*.  
Antimicrob.Agents.Chemother., 1989, 33: 1302-1307.

49.LACROIX J.M., F. LAMOTHE, F. MALOUIN

Role of *Bacteroides bivius*  $\beta$ -lactamase in  $\beta$ -lactam susceptibility.  
Antimicrob.Agents Chemother., 1984, 26: 694-698.

50.LAMOTHE F., F. AUGER, J.M. LACROIX

Effect of clavulanic acid on the activities of ten  $\beta$ -lactam agents against members  
of the *Bacteroides fragilis* group.  
Antimicrob.Agents Chemother., 1984, 25: 662-665.

51.LE GOFFIC F., J.ANDRILLON-SPIEGEL, R. LETARITE

Purification des beta-lactamases par chromatographie d'affinité.  
Biochimie, 1975, 57: 29-34.

52.LEUNG T., J.D. WILLIAMS

Beta-lactamases of subspecies of *Bacteroides fragilis*.  
J.Antimicrob.Chemother.,1978, 4: 47-54.

53.LOWRY O.H.

Protein measurement with the folin phenol reagent.  
J.Biological.Chemistry,1951, 193: 265-275.

54.MAGOT M.

Some properties of the *Clostridium butyricum* group beta-lactamase.  
J.Gen.Microbiol., 1981, 127: 113-119.

55.MARTIN C.

Les beta-lactamases des bactéries du genre *Bacteroides* .  
Thèse de doctorat en médecine, Grenoble, 1989.

56.MARTIN C., A. SEDALLIAN, V.PORTMAN

Détection de beta-lactamase chez les *Bacteroides* du groupe *fragilis*.  
Mèd.Mal.Inf., 1990, 20 hors série: 135-139.

57.MARTIN C.,F. ZIANE, A. SEDALLIAN

Characterization of beta-lactamase from *Prevotella*.  
Fourth European Congress and Second International Symposium on  
anaerobic bacteria and infections, 1992, poster PG 19.

58.MASKELL J.P., M. NASU, J.D. WILLIAMS.

Cephalosporin resistance in the *Bacteroides fragilis* group and the effect of  
clavulanic acid.  
J.Antimicrob.Chemother.,1984,13: 23-30.

59.MATTHEW M.

Plasmid-mediated- $\beta$ -lactamases of gram-negative bacteria: properties and distribution.

J.Antimicrob.Chemother., 1979, 5: 349-358.

60 .MATTHEW M., A.M. HARRIS, M. J. MARSHALL

The use of analytical isoelectric focusing for detection and identification of  $\beta$ -lactamases.

J.Gen.Microbiol., 1975, 88: 169-178.

61.MURRAY P.R., J.E. ROSENBLATT

Penicillin resistance and penicillinase production in clinical isolates of *Bacteroides melaninogenicus* .

Antimicrob.Agents Chemother., 1977, 11: 605-608.

62.NORD C.E., B. OLSSON-LILJEQUIST.

Resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics in *Bacteroides* species.

J.Antimicrob.Chemother.,1981, 8(suppl.D): 33-42.

63.NORD C.E.

Mechanisms of  $\beta$ -lactam resistance in anaerobic bacteria.

Rev.Infect.Dis.,1986, 8 (suppl. 5): S 543-S 548.

64.NORD C.E., M. HEDBERG.

Resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics in anaerobic bacteria, in clinical infections and treatment.

Rev.Infect.Dis.,1990, 12 (suppl. 2): S 231-S 234.

65.NOVICK R.P.

Microiodometric assay of penicilline.

Nature (Lond.),1954, 174: 1012-1013.

66.O' CALLAGHAN C.H., A.MORRIS, S.M.KIRBY

Novel method for detection of  $\beta$ -lactamase by using a chromogenic cephalosporin substrate.

Antimicrob.Agents.Chemother., 1972, 1: 283-288.

67.OLSSON B., T.WADSTRÖM, C.E.NORD

Formation of beta-lactamase in *Bacteroides fragilis* , cell-bound and extracellular activity.

Antimicrob.Agents.Chemother., 1976, 9: 727-735.

68.OLSSON B., K.DORNBUSCH, C.E.NORD

Characterization of thre different  $\beta$ -lactamases from the *Bacteroides fragilis* group.

Antimicrob.Agents.Chemother., 1980, 18: 220-225.

69.PANKUCH G.A., M.R. JACOBS, P.C. APPELBAUM

Susceptibilities of 428 gram-positive and -negative anaerobic bacteria to bay y 3118 compared with the susceptibilities to ciprofloxacin, clindamycin, metronidazole, piperacillin, piperacillin-tazobactam, and cefoxitin. *Antimicrob.Agents.Chemother.*, 1993, 37: 1649-1654.

70.PERRET C.J.

Iodometric assay of penicillinase  
*Nature (Lond.)*,1954, 174: 1012-1013.

71.PHILIPPON A.M., C.G. PAUL, G.A. JACOBY:

Properties of PSE-2  $\beta$ -lactamase and genetic basis for its production in *Pseudomonas aeruginosa* .  
*Antimicrob.Agents.Chemother.*, 1983, 24: 362-369.

72.PIDDOCK L.J.V., R. WISE

Cefoxitin resistance in *Bacteroides* species evidence indicating two mechanisms causing decreased susceptibility.  
*J.Animicrob.Chemother.*, 1987, 19: 161-170.

73.RASHTSCHIAN A., G.R. DUBES, S.J. BOOTH

Transferable resistance to cefoxitin in *Bacteroides thetaiotaomicron*.  
*J.Antimicrob.Chemother.*, 1982, 22: 579-584.

74.RICHMOND M.H., R.B. SYKES

The  $\beta$ -lactamases of gram-negative bacteria and their possible physiologic role.  
In Rose A.H. Tempest D.W., eds, *Adv.Microb.Physiol.*, 1973, 9: 31-88.

74 bis.ROGERS M.B., A.C. PARKER, S.C. JEFFREY

Cloning and characterization of the endogenous cephalosporinase gene Cep A from *Bacteroides fragilis* reveals a new subgroup of Ambler class A beta-lactamases.  
*Antimicrob.Agents.Chemother.*, 1993, 37: 2391-2400.

75.ROLFE R.S., S.M. FINEGOLD

Intestinal  $\beta$ -lactamase activity in ampicillin induced *Clostridium difficile* associated ileocectitis.  
*J.Infect.Dis.*, 1983, 147: 227-235.

76.SALYERS A.A., J. WONG, T.D. WILKINS

Beta-lactamase activity in strains of *B. melaninogenicus* and *Bacteroides oralis* .  
*Antimicrob.Agents.Chemother.*, 1977, 11: 142-146.

77.SAMUNI A.

A direct spectrophotometric Assay and Determination of Michaelis constants for the  $\beta$ -lactamase reaction.  
*Anal. Biochem.*, 1974, 63: 17-26.

- 78.SATO K., M. INOUE, S. MITSUHASHI  
Activity of  $\beta$ -lactamase produced by *Bacteroides fragilis* against newly introduced cephalosporins.  
Antimicrob.Agents.Chemother., 1980, 17: 736-737.
- 79.SATO K., Y. MATSUURA, K. MIYATA  
Characterization of cephalosporinases from *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides thetaiotaomicron* and *Bacteroides vulgatus*.  
J.Antibiot.,1983, 45: 76-85.
- 80.SATO K., K. MIYATA, M. INOUE  
Properties of a new penicillinase type produced by *Bacteroides fragilis*.  
Antimicrob.Agents.Chemother., 1982, 22: 579-584.
- 81.SEDALLIAN A., J.P. BRU, M. DERRIENIC  
Anaérobies et beta-lactamases.  
Méd.Mal.Inf., 1989, 19 (hors série): 107-111.
- 82.SEDALLIAN A.  
Isolement et identification des bactéries anaérobies strictes.Principaux germes isolés de produits pathologiques.  
Méd.Mal.Inf., 1990, 20 (hors série): 83-88.
- 83.SEDALLIAN A., A. BOUCHET, C. MARTIN  
Le groupe *Bacteroides oralis-melaninogenica* (*Prevotella*).  
Méd.Mal.Inf., 1990, 20 (hors série): 173-178.
- 84.SEDALLIAN A., S. ENCK, G. ANTONIOTTI  
Beta-lactamase activity in *Prevotella* species.  
6<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 1993, poster 88.
- 85.SEDALLIAN A., L. DUBREUIL  
Bacteries anaérobies à Gram négatif.  
Dans Freney J., Renaud F., Hansen w., Manuel de Bactériologie clinique (Coll. Option bio.), Ed. 1995, Vol.3: 1633-1649.
- 86.SHAH H.N., M.D. COLLINS  
Proposal for reclassification of *Bacteroides assacharolyticus*, *B. gingivalis*, *B. endodontalis* in a new genus *Porphyromonas*.  
Int.J.Syst.Bacteriol., 38: 128-131.
- 87.SHAH H.N., M.D. COLLINS, J. WATANABE  
Proposal to restrict the genus *Bacteroides* (CASTELLANI and CHALMERS) to *Bacteroides fragilis* and closely species.  
Int.J.Syst.Bacteriol., 39: 85-87.

88.SHAH H.N., M.D. COLLINS

*Prevotella*, a new genus to include *Bacteroides melaninogenicus* and related species formerly classified in the genus *Bacteroides*.  
Int.J.Syst.Bacteriol., 40: 205-208.

89.SHERILL J.M., L.R. Mc CARTY

Comparison of the  $\beta$ -lactamases of *Bacteroides* species.  
Curr.Microbiol., 1981, 6: 327-332.

90.SIMPSON I.N., C.D. PAGE, P.B. HARPER

The contribution of  $\beta$ -lactamases to  $\beta$ -lactam resistance in *Bacteroides fragilis*.  
J.Antimicrob.Chemother., 1982, 9: 29-45.

91.SIMPSON C.N., J.P. MASKELL, J.D. WILLIAMS

The effect of clavulanic acid on the susceptibility of *Bacteroides fragilis* to three acyl-ureidopenicillins, ampicillin and carbenicillin.  
J.Antimicrob.Chemother., 1984, 14: 133-138.

92.SUMMANEN P., V.L. SUTTER, D.M. CITRON

Recent taxonomic changes.  
In Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual, Fifth. Ed., 1993.

93.SNYDMAN D.R., F.R. TALLY, R. KNUPPEL

*Bacteroides bivius* and *Bacteroides disiens* in obstetrical patients: clinical findings and antimicrobial susceptibilities.  
J.Antimicrob.Chemother., 1980, 6: 519-525.

94.SYKES R.B., K. NORDSTRÖM

Microiodometric determination of  $\beta$ -lactamase activity.  
Antimicrob.Agents.Chemother., 1972, 1: 94-99.

95.SYKES R.B., M. MATTHEW

The  $\beta$ -lactamases of gram-negative bacteria and their role in resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics.  
J.Antimicrob.Chemother., 1977, 2: 115-157.

96.SYKES R.B.

The classification and terminology of enzymes that hydrolyze  $\beta$ -lactam antibiotics.  
J.Infect.Dis., 1982, 145: 762-765.

97.TAJIMA M., K. SAWA, K. WATANABE

The  $\beta$ -lactamases of the genus *Bacteroides*.  
J.Antibiot., 1983, 36: 423-428.

98. TALLY F.P., J.P. O' KEEFE, N.M. SULLIVAN  
Inactivation of cephalosporins by *Bacteroides*.  
Antimicrob.Agents.Chemother., 1979, 16: 565-571.
99. THOMPSON J.S., M.H. MALAMY  
Sequencing the gene for an imipenem-cefoxitin-hydrolyzing enzyme (Cfi A) from  
*Bacteroides fragilis* TAL 2480 reveals strong similarity between Cfi A and  
*Bacillus cereus*  $\beta$ -lactamase II.  
J.Bacteriol., 1990, 172: 2584-2593.
100. TIMEWELL R., E. TAYLOR, I. PHILLIPS  
The  $\beta$ -lactamase of *Bacteroides* species;  
J.Antimicrob.Chemother., 1981, 7: 137-146.
101. TIMEWELL R., I. PHILLIPS, J. SODERHOLM  
Isoelectric focusing of *Bacteroides melaninogenicus* group  $\beta$ -lactamases  
Antimicrob.Agents.Chemother., 1981, 19: 700-704.
102. TUNER K., L. LINDQVIST, C.E. NORD  
Purification and properties of a novel  $\beta$ -lactamase from *Fusobacterium*  
*nucleatum* .  
Antimicrob.Agents.Chemother., 1985, 27: 943-947.
103. WALEY S.G.  
A spectrophotometric assay of  $\beta$ -lactamase action on penicillin.  
Biochem.J., 1974, 139: 789-790.
104. WEINRICH A.E., V.E. DEL BENE  
Beta-lactamase activity in anaerobic bacteria.  
Antimicrob.Agents.Chemother., 1976, 10: 106-111.
105. WEXLER H.M., E. MOLITERIS, S.M. FINEGOLD  
Effect of  $\beta$ -lactamase inhibitors on the activities of various  $\beta$ -lactam agents  
against anaerobic bacteria.  
Antimicrob.Agents.Chemother., 1991, 35: 1219-1224.
106. WEXLER H.M., S. HALEBIAN  
Alterations to the penicillin-binding proteins in *Bacteroides fragilis* group:  
a mechanism for non- $\beta$ -lactamase mediated cefoxitin resistance.  
J.Antimicrob.Chemother., 1990, 26: 7-20.
107. WILLIAMSON R.  
Resistance of *Clostridium perfringens* to  $\beta$ -lactam antibiotics mediated by a  
decreased affinity of a single essential penicillin-binding protein.  
J.Gen.Microb., 1983, 129: 2339-2342.

108.YOTUSJI A., S. MINAMI, M. INOUE

Properties of novel  $\beta$ -lactamase produced by *Bacteroides fragilis* .  
Antimicrob.Agents.Chemother., 1983, 24: 925-929.

109.ZIANE F.

Les beta-lactamases des bactéries du genre *Prevotella* (*Bacteroides* du genre  
*oralis-melaninogenicus* ).  
Mémoire du diplôme inter-universitaire de spécialité en biologie médicale,1992.

# RESUME

Les bactéries du genre *Prevotella* sont des bacilles Gram négatif anaérobies strictes proches des *Bacteroides*, et responsables d'infections mixtes opportunistes.

La production d'une beta-lactamase constitutive d'origine probablement chromosomique représente le mécanisme majeur de résistance aux beta-lactamines chez ces espèces. Cette enzyme est retrouvée chez environ 50 % des souches européennes.

La production enzymatique s'accompagne d'une résistance aux céphalosporines et aux aminopénicillines, d'une élévation des CMI de la ticarcilline et de la méristine. La beta-lactamase est proche mais différente de celle des *Bacteroides*, et est inhibée par le paramercuribenzoate de sodium et la cloxacilline.

Notre travail a consisté à évaluer le profil de substrat chez différentes souches de *Prevotella* productrices de beta-lactamase, en déterminant les constantes cinétiques  $V_m$  et  $K_m$  pour chaque souche sur une gamme de substrats. Nous avons étudié le spectre des beta-lactamines hydrolysées par les souches de *Prevotella* productrices de beta-lactamase. Nous retrouvons une activité majeure de type céphalosporinase. Le céfuroxime est hydrolysé préférentiellement, puis la céfalotine, et le céfotaxime. Nous retrouvons une activité lente de l'enzyme vis-à-vis de l'ampicilline, parfois mal détectée. Le profil de substrat peut être considéré comme mixte, avec une activité majeure de type céphalosporinase; il peut être apparenté à celui de la beta-lactamase produite par les *Bacteroides* du groupe *fragilis*.

# MOTS CLES

Beta-lactamase - Anaérobies - *Prevotella* - profil de substrat -  $K_m$  -  $V_m$  -