

## Évaluation in vitro de l'activité de deux bêtalactamines sur le métabolisme oxydatif de granulocytes neutrophiles

### Evaluation of the in vitro activity of two betalactams on the oxidative metabolism of polymorphonuclear neutrophils

J. Behra-Miellet<sup>a,\*</sup>, A. Darchy<sup>a</sup>, B. Gressier<sup>b</sup>, T. Dine<sup>b</sup>, M. Luyckx<sup>b</sup>, C. Brunet<sup>b</sup>, L. Dubreuil<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire de bactériologie clinique, faculté de pharmacie de Lille, 3, rue du Professeur-Laguesse, BP 83, 59006 Lille cedex, France

<sup>b</sup> Laboratoire de pharmacologie, pharmacocinétique et pharmacie clinique, faculté de pharmacie de Lille, 3, rue du Professeur-Laguesse, BP 83, 59006 Lille cedex, France

Disponible sur internet le 03 octobre 2007

#### Résumé

**But de l'étude.** – Il est d'évaluer l'action in vitro de bêtalactamines injectables : l'amoxicilline et son association à l'acide clavulanique, sur le métabolisme oxydatif de granulocytes neutrophiles. Ces leucocytes sont les acteurs majeurs de la « flambée respiratoire » durant laquelle des espèces réactives de l'oxygène, dont le radical anion superoxyde  $O_2^-$ , sont produites pour détruire l'agent infectieux. Une activation de ce processus par les antibiotiques injectés pourrait renforcer l'effet bactéricide ou expliquer certains effets indésirables.

**Matériels et méthodes.** – Deux modèles permettent ici de mesurer les quantités d' $O_2^-$  produites en présence des antibiotiques testés. En modèle cellulaire,  $O_2^-$  est généré par des granulocytes neutrophiles stimulés ou non (séparés grâce à un gradient de Ficoll à partir de sang frais), et dans le modèle acellulaire, par le système xanthine–xanthine oxydase. Le dosage d' $O_2^-$ , effectué par spectrophotométrie, utilise la réduction du ferricytochrome C.

**Résultats.** – La production d' $O_2^-$  par les granulocytes neutrophiles est accrue en présence de ces antibiotiques. L'utilisation ou non de divers stimulants permet de mettre en évidence un effet pro-oxydant significatif de la part de l'amoxicilline, encore plus marqué en l'absence de tout stimulant et moindre avec son association à l'acide clavulanique.

**Conclusion.** – L'amoxicilline pourrait, soit activer la NADPH-oxydase du granulocyte neutrophile, soit induire son activation par effet de membrane, soit interférer avec la voie d'activation du zymosan. L'effet pro-oxydant résultant renforce probablement la bactéricidie.

© 2007 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

#### Abstract

**Study aims.** – The aim was to evaluate the in vitro effects of amoxicillin and its combination with clavulanic acid, two  $\beta$ -lactams intravenously injected, on the oxidative metabolism of polymorphonuclear neutrophils. These cells play the major role in the “respiratory burst” as they produce superoxide anion to kill the infectious agent. An activation of this process by the injected antibiotics could enhance the bactericidal action or explain some of adverse effects.

**Materials and methods.** – Two models were used to estimate the  $O_2^-$  amounts produced in the presence of the antimicrobial agents. In the cellular model,  $O_2^-$  was generated by neutrophils artificially stimulated or not (separated by a gradient centrifugation through Histopaque 1077). In the acellular model,  $O_2^-$  was produced by the xanthine–xanthine oxidase system.  $O_2^-$  was measured by spectrophotometry using the ferricytochrome C reduction.

**Results.** – The  $O_2^-$  production by polymorphonuclear neutrophils was increased when both antibiotics were added to the reaction mixture. A significant activation of the cell oxidative metabolism was observed with amoxicillin using various stimulating agents, that was higher without stimulation and lower when amoxicillin and clavulanic acid were associated.

\* Auteur correspondant.

Adresses e-mail : [josette.behra@univ-lille2.fr](mailto:josette.behra@univ-lille2.fr) (J. Behra-Miellet), [luc.dubreuil@univ-lille2.fr](mailto:luc.dubreuil@univ-lille2.fr) (L. Dubreuil).

**Conclusion.** – Amoxicillin could either activate polymorphonuclear neutrophils NADPH-oxidase or cause its activation by a membrane effect, or interfere with the zymosan activation way. It could then be supposed that this antimicrobial agent intensified the bactericidal effects.  
© 2007 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

**Mots clés :** Amoxicilline ; Acide clavulanique ; Métabolisme oxydatif ; Granulocytes neutrophiles

**Keywords:** Amoxicillin; Clavulanic acid; Oxidative metabolism; Polymorphonuclear neutrophils

## 1. Introduction

L'interaction de molécules exogènes à l'organisme, telles que des médicaments antibiotiques, avec le métabolisme oxydatif (MO) des granulocytes neutrophiles (GrN), fait l'objet de nombreuses études. Le but de notre étude est de rechercher d'éventuels effets pro- ou antioxydants de la part de deux  $\beta$ -lactamines à travers des modèles cellulaires utilisant des GrN et des modèles acellulaires. Ces effets peuvent en effet aboutir soit à un renforcement de la bactéricidie, mais peut-être aussi à des effets délétères pour les cellules humaines [1–4], soit à un effet protecteur anti-inflammatoire, moins efficace alors sur le plan de la bactéricidie.

Sont testées ici l'amoxicilline (AMX), antibiotique de choix très largement administré en thérapeutique et son association à l'acide clavulanique (AMC). Pascual et al. ayant déjà étudié, en 1989, leurs effets sur les fonctions des GrN vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* [5], nous nous proposons ici d'explorer plus avant l'impact de ces molécules sur les différentes voies d'activation du MO des GrN en utilisant non plus des bactéries, mais des activateurs chimiques de la flambée respiratoire. Seront testées des spécialités commercialisées, sous forme injectable par voie intraveineuse, dans un souci de reproduire au mieux la réalité clinique.

L'AMX ou acide (-)-6-[2-amino-2-(p-hydroxyphényl)acétamido]-3,3-diméthyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyclo[3.2.0]heptane-2-carboxylique (Fig. 1) est une aminopénicilline. Elle comprend l'acide 6-aminopénicillanique (cycle thiazolidine lié au cycle  $\beta$ -lactame qui est la partie efficace de la molécule). L'addition d'un groupe amino à la benzylpénicilline lui confère une résistance à l'acidité gastrique et une meilleure efficacité sur les entérobactéries. Le groupement hydroxyl en position para de l'anneau benzyl favorise l'absorption orale de l'AMX par rapport à d'autres pénicillines. L'AMX, largement utilisée, étend encore ses possibilités grâce à son association à l'acide clavulanique (Fig. 1) d'activité bactérienne intrinsèque

faible, mais puissant inhibiteur de  $\beta$ -lactamases, restaurant ainsi l'activité de la  $\beta$ -lactamine qui lui est associée [6].

Pour respecter la physiologie des GrN, l'action des antibiotiques sur leur MO est évaluée en milieu réactionnel tamponné de pH 7,4. La flambée respiratoire est générée in vitro à l'aide de substances chimiques activatrices en présence des GrN et de différentes concentrations en antibiotiques [7–9]. La cascade oxydative débute grâce la NADPH-oxydase [10] (Fig. 2) dont les composants, dans la cellule quiescente, sont présents au niveau de la membrane plasmique ou au niveau cytoplasmique. L'activation provoque leur translocation vers la membrane plasmique pour former alors un complexe multimérique enzymatique qui utilise le NADPH pour réduire l'oxygène moléculaire en  $O_2^-$  [11,12].

Cette première espèce réactive de l'oxygène (ERO), produite par les GrN stimulés et l'anion superoxyde, est évaluée ici par méthode spectrophotométrique. Parallèlement, les GrN sont testés pour leur viabilité en présence des différentes concentrations d'antibiotiques et de stimulants. La comparaison entre modèles cellulaire et acellulaire mettant en présence  $\beta$ -lactamines et ERO, ainsi que l'utilisation de plusieurs systèmes de stimulation permettent de mieux comprendre l'interaction entre les antibiotiques et le MO des GrN.

## 2. Matériels et méthodes

### 2.1. Préparation des suspensions des GrN

Les GrN sont isolés selon Cabanis et al. [13] à partir de sang veineux humain, sain et fraîchement prélevé sur héparine. Ils sont obtenus sans contaminants gênants (lymphocytes  $< 2 \pm 0,8$  % et érythrocytes  $< 0,3 \pm 0,1$  %) par centrifugation en gradient de densité dans de l'Histopaque<sup>®</sup>-1077 (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) suivie d'une hémolyse des hématies en solution de  $NH_4Cl$  bicarbonatée. Après lavage, les GrN sont remis en suspension en solution tampon Hank's Hepes (HH) (Sigma-Aldrich) pH 7,4. Une numération en cellule de Thoma puis un test de vitalité des GrN par le test d'exclusion au bleu de Trypan à 2 % dans une solution de NaCl à 0,9 % (Sigma-Aldrich) sont réalisés. Les pourcentages de vitalité requis sont supérieurs à 95 %. La suspension cellulaire est ajustée à la concentration désirée.

### 2.2. Antibiotiques et concentrations choisies

L'AMX provient des laboratoires Panpharma (Fougères, France) et l'AMC (Augmentin<sup>®</sup>), des laboratoires Glaxo-SmithKline (Hérouville, France). La gamme de concentrations choisies (de 0,01  $\mu g/ml$  à 1000  $\mu g/ml$ ) est large de

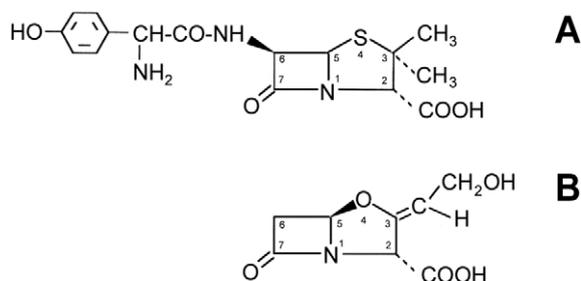


Fig. 1. A. Amoxicilline. B. Acide clavulanique.

Download English Version:

<https://daneshyari.com/en/article/4136535>

Download Persian Version:

<https://daneshyari.com/article/4136535>

[Daneshyari.com](https://daneshyari.com)