

## Production périplasmique de $\beta$ -lactamases par des isolats cliniques

B. Zeba<sup>(1)</sup>, J. Simporé<sup>(2)</sup>, O.G. Nacoulma<sup>(1)</sup>

(1) Laboratoire de Chimie et de Biochimie Appliquée (Enzymologie), UFR-SVT, Université de Ouagadougou, Burkina Faso 03, BP 7021, Ouagadougou 03.

(2) Centre médical Saint Camille-Ouagadougou, Burkina Faso 01, BP 444, Ouagadougou 01.

Correspondance : B. ZEBÀ, voir adresse ci-dessus.

e-mail : b\_zeba@yahoo.fr

### Résumé/Abstract

#### Production périplasmique de $\beta$ -lactamases par des isolats cliniques

B. Zeba, J. Simporé, O.G. Nacoulma

Le profil de production des  $\beta$ -lactamases a été examiné chez plusieurs isolats cliniques récoltés au centre médical Saint Camille de Ouagadougou au Burkina Faso. Le but recherché est de mettre en évidence les conditions expérimentales qui accroissent le niveau périplasmique de  $\beta$ -lactamase et donc maximisent le rendement extractif de l'enzyme à des fins expérimentales. Les facteurs temps de croissance et concentration de l'imipénème en tant qu'inducteur ont été explorés. Les résultats obtenus suggèrent la nécessité de la prise en compte des facteurs « temps de croissance et concentration de l'inducteur » pour l'optimisation du rendement dans une perspective préparative. Ces résultats mettent en lumière pour chaque isolat, l'existence d'une combinaison favorable : temps de croissance/ concentration de l'inducteur qui détermine l'activité enzymatique maximale recherchée.

**Mots-clés :** Bactérie, Gram-négatif, périplasme,  $\beta$ -lactamase, constitutif, inductible, temps de croissance, concentration de l'inducteur.

#### Production of $\beta$ -lactamase from clinical isolates

B. Zeba, J. Simporé, O.G. Nacoulma

The  $\beta$ -lactamase production pattern was examined from several clinical isolates at Saint Camille medical Center of Ouagadougou in Burkina Faso. The aim of this research was to find the optimal experimental conditions increasing the periplasmic level of  $\beta$ -lactamase, and then maximize the yield of extraction for further studies. The growth span and the concentration of inducer imipenem were both explored. The current results strongly suggest the necessity of taking into account both the growth span and inducer concentration for future production yielding. These results enlight for each isolate, the existence of suitable combination: growth span/ inducer concentration that allows the summit of the interest of  $\beta$ -lactamase activity.

**Key words:** Bacteria, Gram-negative, periplasm,  $\beta$ -lactamase, constitutive, inducible, growth span, inducer concentration.

*Antibiotiques* 2005 ; 7 : 183-190

© Masson, Paris, 2005

### Introduction

La production par les bactéries d'enzymes qui hydrolysent le noyau  $\beta$ -lactame est connue et étudiée depuis un peu plus de cinq décennies [1, 2]. Ces enzymes désignées  $\beta$ -lactamases, sont répandues chez un grand nombre de bactéries et sont la principale cause de la résistance bactérienne aux agents anti-infectieux comportant le noyau  $\beta$ -lactame. La production de  $\beta$ -lactamases par les bactéries peut être constitutive ou inductible. Dans le cas où elle est inductible on observe que les bactéries réagissent à la présence

#### Abréviations

Abs. sur l'axe des ordonnées	Absorbance à 600 nm, variation d'absorbance à 482 nm = $V_0$
Abs. <sub>600</sub> <i>ampC</i>	Absorbance à 600 nm gene d'expression de la $\beta$ -lactamase C
AmpC	produit du gène <i>ampC</i> ( $\beta$ -lactamase)
Ampi.	Ampicilline
LB	Luria Bertani
ml	millilitre
mgml <sup>-1</sup>	milligramme par millilitre
$\mu$ gml <sup>-1</sup>	microgramme par millilitre
mn	minute
nm	nanomètre
$V_0$	vitesse au temps proche de zéro
$\Delta A_{482}$	variation d'absorbance à 482 nanomètre
$\Delta t$	variation du temps
<i>Ent. cloacae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Kleb. Pneum</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Cépha	Céphaloridine

de l'inducteur par l'apparition de l'enzyme s'il n'existait pas auparavant ou par l'accroissement de son niveau de production dans le cas où l'enzyme préexistait [3]. Les  $\beta$ -lactamases chromosomiques AmpC ont été largement décrites dans les espèces Gram-négatives comme *Citrobacter freundii*, *Yersinia enterocolitica*, *Morganella morganii*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae* [4]. Dans la plupart des *Enterobacteriaceae*, AmpC est inductible [5] et surproduite. Dans *Proteus vulgaris*, la synthèse d'une  $\beta$ -lactamase de classe A est contrôlée par un système similaire [6]. Des enzymes AmpC d'origine plasmidique comme les  $\beta$ -lactamases de type CMY ont été rencontrées dans les espèces comme *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli* et *Salmonella spp* [7, 8]. Contrairement aux enzymes AmpC chromosomiques, il semblerait que les  $\beta$ -lactamases AmpC codées par les plasmides soient habituellement constitutives, hormis l'enzyme DHA-1, première céphalosporinase inductible identifiée et dont le gène est localisé sur un plasmide [7]. Dans les espèces de *Serratia*, des enzymes AmpC naturellement présents peuvent être inductibles ou constitutifs [9]. L'induction de  $\beta$ -lactamase dans le cas spécifique des *Enterobacteriaceae* a été étudiée surtout pour en comprendre les bases en tant que mécanisme de régulation [3, 10, 11]. Les antibiotiques possédant le noyau  $\beta$ -lactame sont des inducteurs potentiels des  $\beta$ -lactamases chromosomiques AmpC [12, 13]. La présence de l'antibiotique modifie les mécanismes de contrôle du gène *ampC* [14, 15] favorisant son expression. La conséquence sera une augmentation de la quantité de  $\beta$ -lactamase synthétisée. Chez les bactéries à Gram-négatif, les  $\beta$ -lactamases sont normalement sécrétées et maintenues dans l'espace périplasmique.

L'activité  $\beta$ -lactamase présente dans le périplasma est ainsi distincte de l'activité cytoplasmique par sa délocalisation mais aussi par sa relative accessibilité. Une autre particularité de ce type d'activité et non la moins intéressante est sa relative pureté. L'objet des présentes investigations porte sur l'analyse des effets conjoints du temps de croissance bactérienne et de la concentration de l'inducteur en vue d'une production périplasmique optimale. L'activité  $\beta$ -lactamase totale (cytoplasmique et périplasmique)

n'est pas recherchée par cette étude. À notre connaissance, il semble que peu de travaux aient eu pour objectif principal de produire et d'extraire un maximum de  $\beta$ -lactamase périplasmique sous l'effet conjugué du temps et de la concentration de l'inducteur. L'enjeu de ce travail est donc principalement la recherche d'une expression qualitative et quantitative des  $\beta$ -lactamases à partir d'isolats cliniques et ce, à des fins expérimentales ultérieures. La production qualitative correspond à l'obtention de l'enzyme présente principalement dans le périplasma c'est-à-dire sans contamination de la fraction cytoplasmique ; la production « quantitative » est objectivée par une augmentation de la concentration enzymatique.

## Matériel et méthodes

### SOUCHES BACTÉRIENNES

Cette expérience a porté sur un éventail de bactéries isolées d'échantillons biologiques humains (urines, selles, prélèvement vaginal), dont un *Escherichia coli*, deux *Enterobacter cloacae* et trois *Klebsiella pneumoniae*. Ces isolats cliniques ont été retenus principalement sur la base de leur fréquence d'apparition, de leur production de  $\beta$ -lactamases et du profil de substrats de ces  $\beta$ -lactamases.

Ces souches ont été identifiées par le système Api 20E (bioMérieux, France).

### CONDITIONS DE CULTURE ET MILIEUX

Pour les identifications et les purifications, les bactéries ont été cultivées sur milieu de gélose de soja tryptique (Difco) en boîtes de Pétri à 37 °C. Pour la production d'enzymes, elles ont été cultivées dans un bouillon de culture Luria Bertani (LB) (Difco) tamponné à pH 7, sous agitation à 250 tours par minute et à 37 °C. Les inductions ont été réalisées au moyen de l'imipénème comme indiqué ci-après.

### PRÉPARATION DES EXTRAITS ENZYMATIQUES

Chez les bactéries à Gram-négatif, les  $\beta$ -lactamases sont normalement sécrétées dans l'espace périplasmique. Pour ce faire, les phases périplasmiques (censées contenir l'activité  $\beta$ -lactamase) ont été

préparées, soit par la méthode physique des cycles de congélation/décongélation [16, 17], soit par digestion au moyen du lysozyme [18]. L'activité cytoplasmique a été libérée par traitement des cellules aux ultrasons [19].

L'activité enzymatique basale dans la cellule bactérienne est supposée constitutive. Par conséquent, l'accroissement de cette activité en présence d'un inducteur (ici l'imipénème) est supposé induit. Notre objectif a été de rechercher les paramètres temps de croissance et concentration de l'inducteur qui augmentent la concentration de  $\beta$ -lactamase dans l'espace périplasmique des espèces analysées.

### DÉTERMINATION DE LA MEILLEURE CONCENTRATION DE L'IMIPÉNÈME UTILISÉ COMME INDUCTEUR

Il s'est agi de trouver la concentration d'imipénème qui accroît le taux d'enzyme sans lyser la bactérie hôte. Pour ce faire, 50 ml de milieu LB ont été inoculés par une pré-culture pure de la souche à étudier. Au bout de 60 mn, les suspensions cellulaires ont été réparties dans 5 erlenmeyers de 50 ml (10 ml de suspension cellulaire par erlenmeyer). De l'imipénème a été ajouté aux différents contenus pour avoir 0,1  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , 0,25  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , 0,5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  et 1  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de milieu de culture. L'erlenmeyer à 0  $\mu\text{g ml}^{-1}$  a servi d'échantillon contrôle. Les cultures ont été arrêtées au bout de 3 heures. Pour chaque échantillon il a été prélevé (sous agitation) 1 ml de cellules pour mesure d'absorbance à 600 nm et une extraction a été réalisée sur le reste de la culture pour mesure de l'activité ( $V_0$ ). La concentration en imipénème qui a donné la meilleure activité sans entraîner un phénomène lytique des cellules a été retenue pour l'expérience suivante, à savoir la détermination du temps de culture donnant la meilleure production en  $\beta$ -lactamase.

### DÉTERMINATION DU TEMPS DE CULTURE DONNANT LA MEILLEURE PRODUCTION EN $\beta$ -LACTAMASE

Pour déterminer le temps au bout duquel l'activité enzymatique est la plus intense (taux d'enzyme le plus élevé), il a été procédé de la façon suivante :

Download English Version:

<https://daneshyari.com/en/article/9275272>

Download Persian Version:

<https://daneshyari.com/article/9275272>

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