

République Algérienne Démocratique et Populaire

UNIVERSITÉ ABOUBEKR BELKAID - TLEMCEM

Faculté des Sciences

DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE

MEMOIRE

En vue de l'obtention du diplôme de

Magister

En Biologie moléculaire et cellulaire

Thème :

**Evaluation de l'activité antibactérienne
de neufs monobactames de synthèse
sur les souches de *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*,
Staphylocoque et Entérocoque.**

Présenté par :

Melle BOUDJEMAA Fatima

Sous la Direction de :

Mr KAJIMA M.

Directeur de Thèse

Mr BOUCHERIT K.

Co - Promoteur

Année Universitaire : 1999 - 2000

SOMMAIRE

1ère Partie : Synthèse bibliographique

I- INTRODUCTION	1
II- LES MONOBACTAMES	9
II.1- ORIGINE DES MONOBACTAMES	9
II.2- STRUCTURE CHIMIQUE.....	9
II.3- PROPRIETES PHYSICO – CHIMIQUES DES MONOBACTAMES:	11
II.4- RELATIONS STRUCTURE – ACTIVITE : :	11
II.4.1- Spectre antibactérien des monobactames :	11
II.4.2- Groupements activateurs du noyau β -lactame.....	13
II.4.3- Stabilité aux β -lactamases.....	15
III- MODE D'ACTION DES β -LACTAMES.....	17
III.1- STRUCTURE ET BIOSYNTHESE DE LA PAROI BACTERIENNE	17
III.1.1- Structure du peptidoglycane	17
III.1.2- Biosynthèse du peptidoglycane.....	17
III.2- ACTION DES β -LACTAMES	19
III.3- BACTERIOLYSE SECONDAIRE	20
III.4- RESISTANCE AUX β -LACTAMES	22
III.4.1- Défaut de pénétration des β - lactames dans la bactérie.....	22
III.4.2- Défaut d'affinité entre les P.L.P et l'antibiotique	23
III.4.3- Inactivation par des systèmes enzymatiques.....	23

2^{ème} Partie : Matériel et méthodes

I- MATERIEL	25
I.1- MATERIEL BIOLOGIQUE	25
I.2- MILIEU DE CULTURE:	25
I.3- MONOBACTAMES DE SYNTHESE	25
II- METHODES	26
II.1- PREPARATION DE LA PRECULTURE	26
II.2- EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE:	28
II.2.1- Méthode de diffusion sur gélose	28
II.2.2- Méthode de dilution.....	29

II.3- DETERMINATION DES CMI	29
II.4- EFFET MORPHOLOGIQUE:	30
II.5- REPRODUCTIBILITE DES RESULTATS:.....	30

3^{ème} Partie : Résultats et interprétations

1- EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DES MONOBACTAMES DE SYNTHESE	31
1.1- PAR LA METHODE DE DIFFUSION SUR GELOSE	31
1.2- PAR LA METHODE DE DILUTION EN MILIEU LIQUIDE:	33
1.2.1- <i>Effet des monobactames sur les souches à Gram négatif</i>	33
1.2.2- <i>Effet des monobactames sur les souches à Gram positif</i>	36
1.2.3- <i>Conclusion</i>	39
2- DETERMINATION DES CMI.....	45
2.1- SOUCHES A GRAM POSITIF	45
2.2- SOUCHES A GRAM NEGATIF	45
3- EFFET MORPHOLOGIQUE DES MONOBACTAMES DE SYNTHESE.....	48
3.1- SUR LE P. AERUGINOSA	48
3.2- SUR E. COLL.....	51
3.3- SUR LES AUTRES SOUCHES	53

4^{ème} Partie : Discussion générale

DISCUSSION GENERALE.....	55
CONCLUSION.....	60
REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE	

Résumé

Dans ce travail, nous nous sommes proposés d'étudier le pouvoir antibactérien de neufs monobactames de synthèse (NF, F, A, H, I', T, BHA, BHC et BHF) élaborés au laboratoire de chimie organique du département de chimie de l'Université ABOUBEKR BELKAID de Tlemcen, sous la direction de Mr KAJIMA M.

Le pouvoir antibactérien de ces monobactames a été testé sur quatre souches bactériennes : *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* (souches à Gram négatif), Staphylocoque et Entérocoque (souches à Gram positif).

L'activité antibactérienne, testée par deux méthodes classiques (méthode de diffusion sur gélose et méthode de dilution en milieu liquide), a été retrouvée pour tous les produits de synthèse utilisés. Celle-ci est, dans l'ensemble, satisfaisante pour les produits NF, F, A, H, I', T porteurs de groupements carbonyle et amino activateurs du noyau β -lactame. Par contre, les produits BHA, BHC et BHF ayant un azote substitué en N-1 se sont montrés faiblement inhibiteurs.

Certains produits comme le produit NF et I' se sont montrés actifs aussi bien sur les souches à Gram positif que celles à Gram négatif.

Les résultats relatifs à la détermination de CMI sont encourageants. En effet, on enregistre des CMI de 60 $\mu\text{g/ml}$ pour le produit NF sur les bactéries à Gram positif c'est-à-dire Staphylocoque et Entérocoque. En revanche, pour les bactéries à Gram négatif les CMI sont relativement élevés, elles varient entre 90 et 120 $\mu\text{g/ml}$. Ces CMI restent élevés par rapport aux CMI des β -lactames usuels ou de l'aztréonam, ceci pourrait s'expliquer par la faible pénétration des produits de synthèse à travers la membrane externe.

Aux concentrations subinhibitrices, l'effet morphologique de ces monobactames sur *Pseudomonas aeruginosa* est le même que celui provoqué par l'aztréonam, c'est-à-dire la croissance des cellules sous la forme de filaments plus ou moins longs, cet effet est dû à l'inhibition de la PLP3 enzyme de la septation. Par contre, chez *E. coli* on obtient des cellules ovoïdes probablement à la suite de l'inhibition de la PLP2 enzyme de la morphologie globale de la bactérie.

Les résultats des tests effectués dans les mêmes conditions se sont avérés pour la plupart reproductibles et on remarque qu'en général les produits de synthèse provoquent une inhibition stable de la croissance bactérienne des souches testées.

Mots clés : Monobactames de synthèse, activité antibactérienne, souches bactériennes : Gram négatif, Gram positif.

1^{ÈRE} PARTIE :

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I- Introduction

Les maladies infectieuses ont longtemps représenté la principale cause de mortalité dans le monde, en particulier chez les jeunes enfants.

Ceci reste vrai actuellement dans les pays en développement. Cependant, on peut attribuer le recul spectaculaire en quelques décennies de la mortalité infectieuse surtout dans les pays industrialisés à plusieurs facteurs parmi lesquels l'antibiothérapie [BERCHE P., 1997].

Les antibiotiques ont montré leur extraordinaire efficacité à lutter contre les maladies d'origine bactérienne comme la tuberculose, les méningites purulentes, la lèpre, les maladies sexuellement transmissibles et les diarrhées (Shigelloses, choléra).

Dans les années 40, la tuberculose était l'un des fléaux de l'humanité, elle le redevient actuellement dans certains pays [BERCHE P., 1997]. La découverte de la streptomycine en 1943 a permis de résoudre momentanément le problème de la tuberculose. L'apparition de souches de bacilles tuberculeux résistants à la streptomycine dès le début des années 50 a stimulé la recherche de nouveaux agents antituberculeux comme l'isoniazide, la D-cyclosérine et plus tardivement l'éthambutol, l'éthionamide, et plus récemment la pyrazinamide [BRYSKIER A., 1997].

Les β -lactamines constituent l'un des groupes les plus importants et les plus utilisés dans le traitement des infections, et ce en raison de leur faible toxicité et leur bonne tolérance par l'organisme [NEUMAN M., 1990]. Actuellement l'arsenal des antibiotiques compte plus de 50 pénicillines, 70 céphalosporines, 3 carbapénèmes et deux monobactames [BRYSKIER A., 1997].

Il s'agit donc d'une famille extrêmement complexe, très diversifiée et qui est toujours en pleine évolution avec de nouveaux produits paraissant continuellement.

Les β -lactamines sont caractérisées par la présence d'un cycle commun : le cycle β -lactame qui est le support de l'activité antibactérienne [CARRAZ et al., 1988].

Leur classification est basée sur l'absence ou la présence ainsi que la nature du second cycle [BAUMGARTNER J.D., 1992] (tableau 1).

On distingue 4 sous-groupes majeurs :

- Les pénames (pénicillines).
- Les céphèmes (céphalosporines, carbacéphèmes, oxa-1-céphèmes).
- Les pénèmes (impénèmes, pénèmes).
- Les β -lactamines monocycliques (aztréonam)

Après l'isolement de la pénicilline puis de la céphalosporine, la famille des β -lactamines s'est agrandie de nouvelles molécules obtenues par hémisynthèse telles que les aminopénicillines (ampicilline), les carboxypénicillines (ticarcilline), les uréidopénicillines (pipéracilline, azlocilline) les pénicillines antistaphylococciques (mécicilline, cloxacilline), les amidinopénicillines (mécillinam) ainsi que les céphalosporines du 1^{ère}, 2^{ème}, 3^{ème}, et 4^{ème} génération [BAUMGARTNER J.D., 1992]

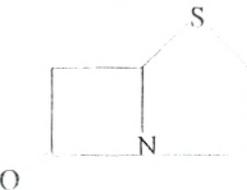
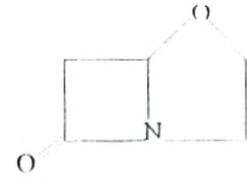
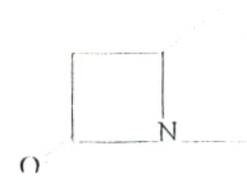
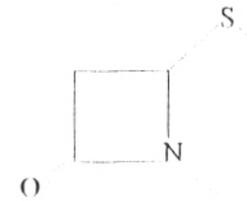
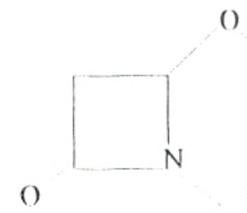
Parallèlement dans le domaine des pénicillines et des céphalosporines, deux nouveaux groupes de β -lactames ont connu d'importants développements durant les deux dernières décennies : Les monobactames et les carbapénèmes.

Depuis l'isolement des nocardicines en 1976 [AOKI et al., 1976] puis de la sulfazécine et le SQ 26,180 quelques années plus tard [BRION J.D., 1992], les monobactames retiennent une attention particulière. L'intérêt qui leur est porté vient de la constatation qu'un noyau monocyclique pouvait avoir une activité antibactérienne potentielle.

Les lactames naturels, à l'exception des nocardicines, sont caractérisés par une structure commune : l'acide 2-oxo-azétidine-1- sulfonique mais se distinguent entre eux par la nature de la chaîne latérale en position 3 . Les monobactames naturels montrent une faible activité antibactérienne, des modifications de chaînes latérales sont nécessaires pour en améliorer les propriétés.

Tableau 1 : Nomenclature des β -lactames en fonction de la structure de leur noyau.

[BAUMGARTNER J.D., 1992]

<i>Squelette de la molécule</i>	<i>Nomenclature</i>	<i>Principaux exemples</i>
	Monobactame	Acide 3-amino monobactamique et dérivés : aztréonam, etc.
	Péname	Acide 6-aminopénicillanique et dérivés : pénicillines, etc. ; mécillinam, sulbactam
	Clavame	Acide clavulanique
	Carbapénème	Thiénamycine, imipénème, acide olivanique
	Céphème	Acide 7-amino céphalosporanique et dérivés : céphalosporine de 1 ^{ère} , 2 ^{ème} et 3 ^{ème} génération, céphamycines (céfoxitine).
	Oxacéphème	Latamoxef

Depuis leur découverte, de nombreuses molécules de monobactames ont été synthétisées. Des modifications structurales par analogie avec les travaux déjà réalisés sur les systèmes bicycliques ont abouti en 1981 à l'introduction en thérapeutique de l'aztréonam puis du tigemonam.

L'aztréonam ou SQ 26,776 possède une chaîne aminothiazolyl et un groupement iminocarboxypropyl en position 3 (figure 1). Cette structure lui confère une excellente activité contre les *enterobacteriaceae*. La fonction acide sur la chaîne imino permet la stabilité aux céphalosporinases et une activité contre *Pseudomonas aeruginosa*. [BARRY Et al., 1985]. La présence du méthyle en position 4 rend la molécule stable aux β -lactamases [BUSH et al., 1982]. Cette configuration de l'aztréonam lui fait perdre toute activité sur les bactéries à Gram positif et les anaérobies [JACOBUS et al., 1982] ; [NEU H., 1983]. Son activité biologique a été comparée à celle des céphalosporines de 3^{ème} génération contre des centaines d'espèces bactériennes [NEU et al., 1981] ; [SHAH et al., 1981]. Ces comparaisons montrent clairement que l'aztréonam possède une activité antibactérienne égale sinon supérieure à celle des céphalosporines de 3^{ème} génération [SYKES et al., 1982]. (Tableau 2).

Le tigemonam est le monosulfactame le plus connu (figure 2). Il se caractérise par son administration orale. In vitro, le tigemonam possède une bonne activité antibactérienne contre la plupart des entérobactéries avec des CMI₉₀ de 1,2 μ g/ml. Cette valeur est nettement inférieure à celle enregistrée pour d'autres β -lactamines comme l'amoxicilline. Le tigemonam est résistant aux β -lactamases des bactéries à Gram positif et négatif [SYKES et al., 1986].

Ces monobactames sont donc caractérisés par leur puissante activité anti-Gram négatif. Leur action anti-*Pseudomonas* est acceptable, elle semble s'améliorer significativement par l'incorporation du groupement catéchol ou hydroxypyridone sur la molécule de base de l'azotréonam, probablement par amélioration de la pénétration à travers la paroi bactérienne [ARNOULD et al., 1982]. Le produit SQ 83,360 dont le groupement hydroxypyridone a été greffé sur le noyau monocarbame, possède une excellente activité antibactérienne contre les *enterobacteriaceae* (figure 3). Cette activité est excellente contre *P. aeruginosa* avec une valeur de CMI₉₀ de 0,05 μ g/ml.

Tableau 2 : Spectre antibactérien de l'azotréonam comparé à celui des céphalosporines de 3^{ème} génération. [SYKES et al., 1982].

Genre	CMI ₉₀ (µg/ml)			
	Aztréonam	Céfotaxime	Céftazidime	Céfoperazone
<i>Staphylococcus aureus</i>	> 100	3,1	12,5	2,8
<i>Staphylococcus pyogenes</i>	12,5	< 0,1	0,2	0,1
<i>Staphylococcus pneumoniae</i>	> 100	< 0,1	0,4	< 0,1
<i>Staphylococcus faecalis</i>	> 100	> 100	> 100	24,4
<i>Bacteroïdes fragilis</i>	> 100	> 100	> 100	> 100
<i>Escherichia Coli</i>	0,2	0,2	0,4	> 100
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,3	0,3	1,1	> 100
<i>Enterobacter cloacae</i>	12,5	25	12,5	100
<i>Enterobacter aerogenes</i>	33,3	42,9	> 100	> 100
<i>Serratia marcescens</i>	1,6	8,4	1,5	> 100
<i>Proteus mirabilis</i>	< 0,1	< 0,1	01	2,4
<i>Proteus vulgaris</i>	< 0,1	5,5	< 0,1	5,8
<i>Proteus rettgeri</i>	< 0,1	0,2	2,3	10,7
<i>Proteus morgani</i>	0,6	1,6	3,1	6,3
<i>Providencia stuarti</i>	< 0,1	3	4,7	> 100
<i>Salmonella sp</i>	0,3	0,3	1,4	7,5
<i>Citrobacter freundii</i>	0,7	0,4	2	> 100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12	47,8	3,2	12
<i>Haemophilus influenzae Amp</i>	0,2	< 0,1	0,2	0,1
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	0,2	< 0,1	< 0,1	0,1

Cette valeur est 300 fois meilleure que celle de l'aztréonam et 60 fois plus que celle de la céftazidime [SYKES et al., 1986] .

Les éclatants succès de l'antibiothérapie furent cependant rapidement assombris par l'émergence de micro-organismes résistants aux antibiotiques. Dès la découverte de la pénicilline G, des souches de Staphylocoques productrices de pénicillinases furent décrites. Les micro-organismes résistent aux antibiotiques par divers mécanismes [JARLIER V., 1997] : production d'enzymes détruisant l'antibiotique, altération des cibles d'action des antibiotiques, imperméabilité de la bactérie aux antibiotiques, efflux actif de l'antibiotique éliminé par des pompes à l'extérieur de la bactérie.

L'adaptabilité du monde bactérien à l'action des antibiotiques fait qu'il existe toujours des problèmes non-résolus. Pour y remédier les chercheurs ont adopté plusieurs stratégies parmi lesquelles le développement et l'utilisation de nouveaux β -lactames qui viennent sans cesse renforcé l'arsenal antibiotique déjà existant.

La découverte des monobactames et l'étude de leur relation structure-activité a permis de mettre au point des centaines de molécules biologiquement actives. Certaines sont utilisées en thérapeutique comme l'aztréonam (Azactam^{*}) ou le tigemonam, d'autres sont encore en cours de développement . Toutes ces nouvelles molécules pourront contribuer à faire face au problème de la multirésistance qui s'étend sans cesse et qui devient particulièrement préoccupant en milieu hospitalier où les Staphylocoques et certains bacilles à Gram négatifs parmi les entérobactéries et *Pseudomonas* sont souvent responsables d'infection dues à des souches multirésistantes.

C'est dans cette stratégie de synthèse de nouveaux monobactames que s'insère cette étude qui tend à mettre en évidence le pouvoir antibactérien de monobactames synthétisés au laboratoire de chimie organique du département de chimie de l'université ABOUBEKR BELKAID de Tlemcen. Différents groupements ont été greffés sur le cycle β -lactame afin d'en améliorer l'activité antibactérienne.

* Nom commercial

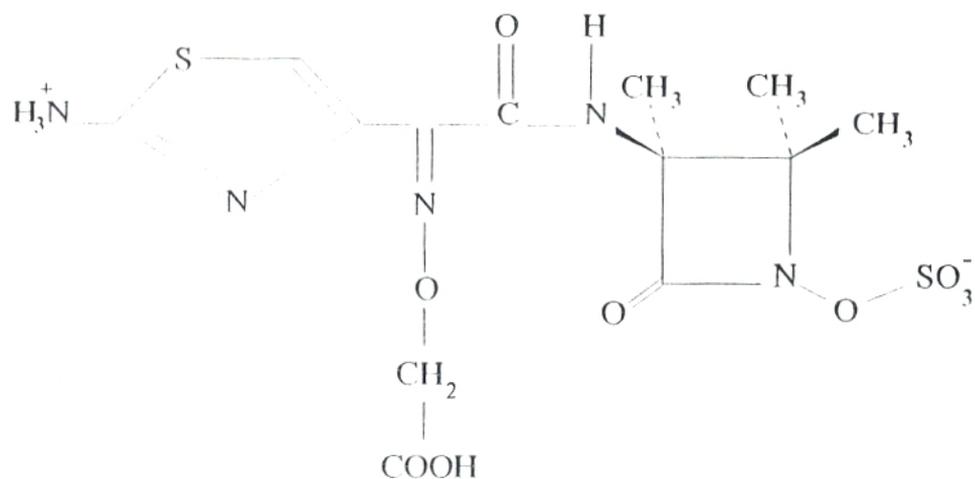


Figure 2 : Structure chimique du tigemonam [SYKES et al., 1986]

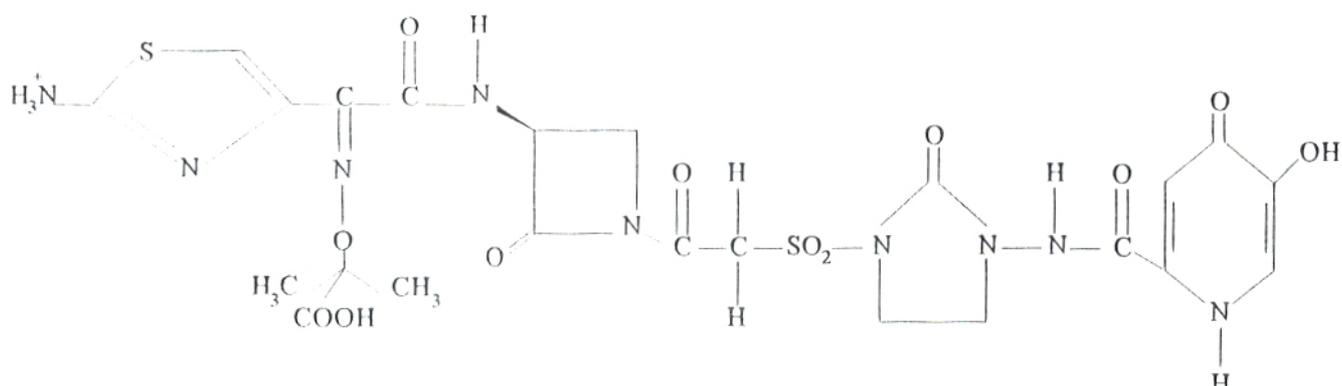


Figure 3 : Structure chimique du produit SQ 83,360

[SYKES et al., 1986]

II- Les Monobactames

Sous le terme « monobactames » sont regroupées des molécules à activité antibactérienne possédant la structure azétidin-2-one [BRION J.D., 1992]

II.1- Origine des monobactames

A l'origine, les pénicillines et les céphalosporines étaient isolées de champignons, elles ont été par la suite détectées chez les bactéries. Toutes les β -lactamines identifiées durant les années 70 étaient produites par les actinomycètes. [SYKES et al., 1981]

La recherche d'antibiotiques β -lactames produits par des bactéries a conduit en 1979 à la découverte d'une nouvelle famille de composés, ayant la même structure de base du noyau β -lactame : les monobactames, (BONNER et SYKES, 1984). Ces derniers sont produits par six genres bactériens (tableau 3). Les microorganismes les plus producteurs sont retrouvés parmi les espèces du genre *Gluconobacter* et *Acétobacter*. Les espèces de *Pseudomonas sp*, *Chromobacterium Violaceum* et *Agrobacterium Radiobacter* productrices de monobactames sont relativement rares [BRION J.D., 1992]. Les monobactames naturels montrent une activité intrinsèque faible mais indiscutable, celle-ci pourrait être améliorée par différentes substitutions sur le cycle β -lactame.

II. 2- Structure chimique

Les monobactames naturels, à l'exception des nocardicines, sont caractérisés par une structure commune, l'acide 2 oxo-azétidine-1-sulfonique (figure 4). La présence de la fonction sulfonique en N-1 est essentielle pour l'activité antibactérienne.

Les monobactames naturels diffèrent entre eux par la nature de l'acyle substitué et par la présence ou l'absence du groupe α -méthoxy en position 3. Les monobactames méthoxylés montrent un haut degré de stabilité à l'hydrolyse par les β -lactamases des bactéries à Gram négatif et Gram positif. Par contre les composés déméthoxylés sont facilement hydrolysés par les enzymes ayant initialement une activité pénicillinasique [SYKES et al., 1981].

Tableau 3 : Structures et sources de monobactames d'origine naturelle [BRION J.D., 1992]

Produit	Structure	Germe producteur		
SQ 26, 180		<i>Chromobacterium violaceum</i>		
SQ 26, 445 (sulfazécine)		Glucanobacter sp. Acétobacter sp.		
(Isosulfazécine)		<i>Pseudomonas mésoacidophila</i>		
EM 5400	X	Y	Z ⁺	M
SQ 26,823	OCH ₃	H	H	Na
SQ 26,875	OCH ₃	H	OH	K
SQ 26,700	H	H	OH	K
SQ 26,970	OCH ₃	OH	OSO ₃ - Na	Na
SQ 26,812	OCH ₃	OSO ₃ - Na	OSO ₃ - Na	
EM 5400		<i>Agrobacterium radiobacter</i>		
SQ 28,332		Flexibacter sp.		
SQ 28,502	Oligopeptides 	Flexibacter sp.		

L'intérêt des monobactames naturels est d'avoir ouvert une nouvelle série chimique qui a abouti aux monobactames de synthèse. La structure de base de ces derniers est l'acide 3-aminobactamique (figure 5). Différentes chaînes latérales peuvent être greffées en C-3 ou C-4 du cycle, des groupements activateurs autre que la fonction sulfonique peuvent être substitués en N-1 donnant ainsi naissance à d'autres types de monobactames biologiquement actifs comme les monophosphames, les monosulfactames, les monocarbanes, ... [CHANTOT et al., 1992].

II.3- Propriétés physico – chimiques des monobactames

Les monobactames se présentent sous la forme de poudres cristallines généralement blanches. Ce sont des sels internes (zwitterions). La structure du zwitterion explique l'insolubilité dans les solvants peu polaires. En revanche, le produit est soluble dans les solvants très polaires.

La présence de deux carbones asymétriques sur l'azétidinone est à l'origine du pouvoir rotatoire.

Le spectre infrarouge comporte une vibration intense à 1760/cm-1 (fonction lactame). La fonction sulfonique en 1 est confirmée par l'existence de deux types de vibration, la première est située entre 1070-1030cm⁻¹ et la seconde entre 1250-1140cm⁻¹.

Selon la nature des substituants d'autres bandes peuvent apparaître [BRION J.D., 1992].

II.4- Relations structure – activité :

II.4.1- Spectre antibactérien des monobactames :

Les monobactames naturels sont des antibiotiques peu actifs. L'incorporation à ces derniers de chaînes latérales qui avaient révolutionné les pénicillines et les céphalosporines ne donne pas toujours les résultats espérés. Ainsi l'incorporation de petits groupements polaires (amine, hydroxyle, carboxyle ou sulfone) sur la chaîne acylaminée en 3 donne des composés faiblement actifs à l'inverse des céphalosporines [BRIAND M.Y., 1986]. Cependant, l'utilisation chez les monobactames de la chaîne latérale aminothiazolyl-méthoxy-imine, commune à la plupart des céphalosporines de

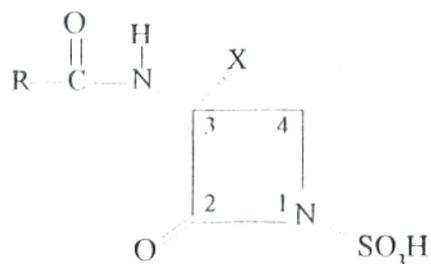


Figure 4 : Structure de base des monobactames naturels

[SYKES et al., 1985]

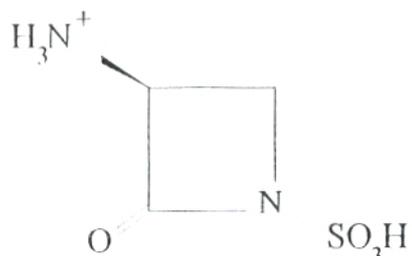


Figure 5 : Structure chimique de l'acide 3-aminobactamique

[BONNER et SYKES, 1984]

3^{ème} génération a été un véritable succès. En effet le produit SQ 81,402, homologue de la céftazidime, possède le même spectre que cette dernière contre les bactéries Gram négatives mais reste instable à l'égard de leurs β -lactamases [BONNER et SYKES, 1984].

Les monobactames de synthèse se caractérisent par leur spectre étroit dirigé contre les bactéries à Gram négatif. Cette propriété est due à la présence de la chaîne aminothiazolyl-méthoxy-imine. D'autres substitutions seront nécessaires pour en améliorer l'activité anti-Gram positif. Les différentes substitutions définissent donc le spectre antibactérien de chaque molécule.

II.4.2- Groupements activants du noyau β -lactame

Différents groupement activants autre que la fonction sulfonique ont été greffés sur le noyau monobactame en N-1 (figure 6). Ces substitutions ont donné naissance à des groupes de composés ayant des propriétés antibactériennes et pharmacocinétiques distinctes.

Le premier groupe de cette nouvelle catégorie d'antibactériens était les monophosphames, leur structure chimique est donnée à la figure 7.

La chaîne aminothiazolyl-méthoxy-imine greffée en C-3 dans cette série de produits donne des composés ayant des propriétés antibactériennes potentielles [KOSTER et al, 1982]. En général les monophosphames sont moins inhibiteurs que leurs correspondants ayant une fonction sulfonique activatrice [BONNER et SKYES., 1984].

Le second groupe est celui des monocarbames avec une fonction carbonyle activatrice (figure 8). Ces composés possèdent des propriétés antibactériennes remarquables et une grande stabilité à l'action des β -lactamases [SLUSARCHYK et al., 1982].

La substitution de la fonction sulfonique par un groupement OSO_3 en N-1 a donné naissance au groupe des monosulfactames (figure 9). Ces composés montrent une plus grande activité contre les bactéries à Gram négatif par rapport à leur homologue possédant une fonction SO_3 . Ils sont aussi actifs sur les bactéries Gram positives. Cependant ces monobactames sont

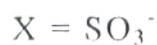
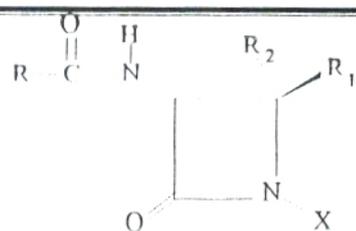


Figure 6 : Groupements activants des monobactames

[SYKES et al., 1986]

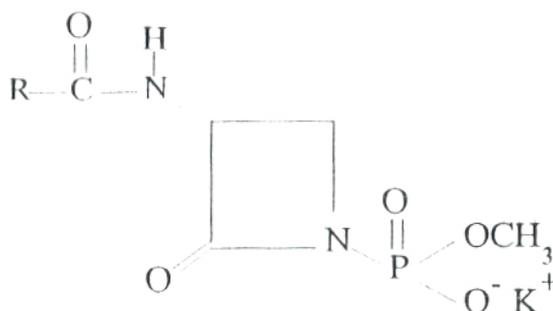


Figure 7 : Structure chimique du produit 2-oxoazétidine-1-phosphonate. [BONNER et SYKES, 1984]

sensibles à l'hydrolyse par les β -lactamases des bactéries Gram négatives [BONNER et SKYES, 1984].

D'autres structures activatrices du noyau β -lactame ont été utilisées avec succès. En effet le groupement tétrazole en N-1 du noyau β -lactame produit des molécules ayant une activité contre les bactéries à Gram négatif et le *Pseudomonas aeruginosa* comparable à celle de l'aztréonam. [YOSHIDA et al., 1986] ; [CHANTOT et al., 1992].

II.4.3- Stabilité aux β -lactamases

L'étude de la relation structure-activité des monobactames a révélé que certaines substitutions en position 4 pouvaient influencer non seulement l'activité antibactérienne mais aussi la stabilité aux β -lactamases.

Dans le cas du SQ 81,402, la substitution d'un α -méthyle en position 4 a donné le SQ 26,776 (l'aztréonam) qui montre une forte activité intrinsèque contre les bactéries à Gram Négatif en plus d'une stabilité aux β -lactamases [BONNER et SKYES, 1984]. La méthylation assure donc la résistance à l'hydrolyse par les β -lactamases bactériennes [YOSHIDA et al., 1986].

Pour les molécules ayant un groupement SO_3^- activateur, une méthylation est essentielle pour la stabilité aux β -lactamases et dans beaucoup de cas contribue à augmenter l'activité intrinsèque de la molécule. Cette même substitution sur des molécules ayant un groupement activateur OSO_3^- possède peu ou pas d'effet sur la stabilité aux β -lactamases [BONNER et SKYES, 1984].

Par contre, dans le cas des groupes carbonyle et phosphate activateurs de la molécule, cette substitution n'offre aucun avantage et dans beaucoup de cas détériore l'activité intrinsèque [BRION J.D., 1992].

Le groupement méthoxy possède aussi un rôle protecteur à l'égard des β -lactamases. En comparant l'activité antibactérienne de deux monobactames le SQ 26,180, monobactame naturel produit par *Chromobacterium violaceum* et son analogue déméthoxylé le SQ 26,396 obtenu par synthèse chimique (figure 10), SYKES et al., 1981 notaient le degré élevé de stabilité aux β -lactamases du produit naturel malgré sa faible activité antibactérienne.

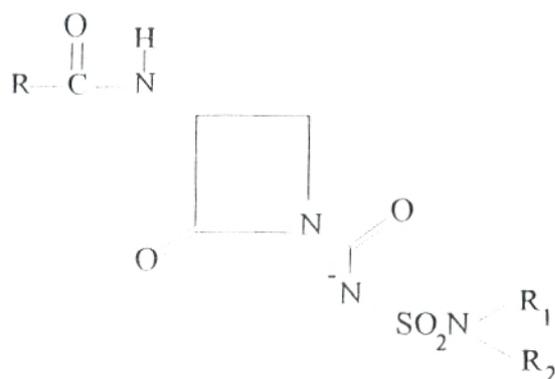


Figure 8 : Structure chimique du produit 2-oxoazétidine-1-carbonyle [BRION J.D., 1992]

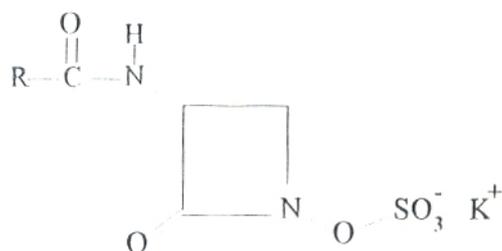


Figure 9 : Structure de base des monosulfactames [BONNER et SYKES, 1984]

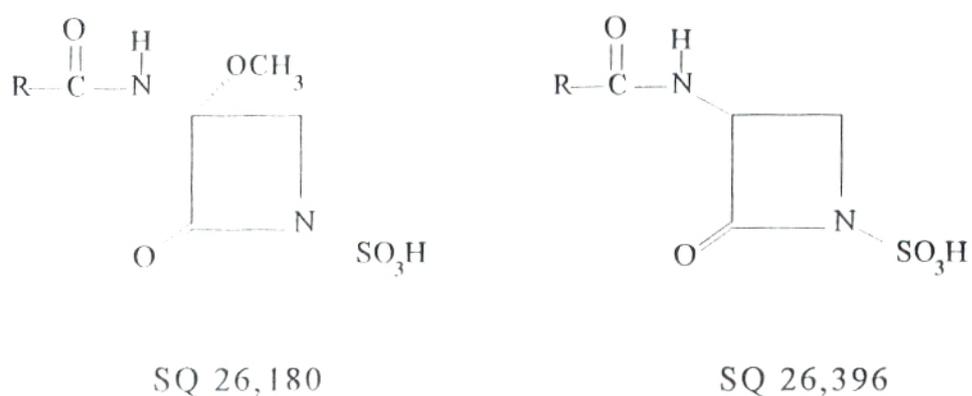


Figure 10 : Structures chimiques des composés SQ 26,180 et SQ 26,396 [SYKES et al., 1981]

III- Mode d'action des β -lactames

Les antibiotiques β -lactames agissent en perturbant la synthèse de la paroi bactérienne.

III.1- Structure et Biosynthèse de la paroi bactérienne

La paroi des bactéries est un organite à peu près constant dans ces cellules. Entourant le cytoplasme, elle donne à la bactérie une forme et la protège de la lyse osmotique. Elle est caractérisée par la présence du peptidoglycane ou mureine. La paroi des bactéries à Gram positif est formée d'une seule couche de peptidoglycane (Figure 11). Par contre, chez les bactéries à Gram négatif, le peptidoglycane est recouvert d'une seconde structure : la membrane externe qui représente une barrière de perméabilité notamment aux antibiotiques.

III.1.1- Structure du peptidoglycane

Le peptidoglycane est un polymère de structure tridimensionnelle composé de longues chaînes de glycanes alternant du N-acétyl-glucosamine (NAG) et du N-acétyl muramyl (NAM).

Un tétrapeptide est branché à chaque sous-unité de glycanes (figure 12).

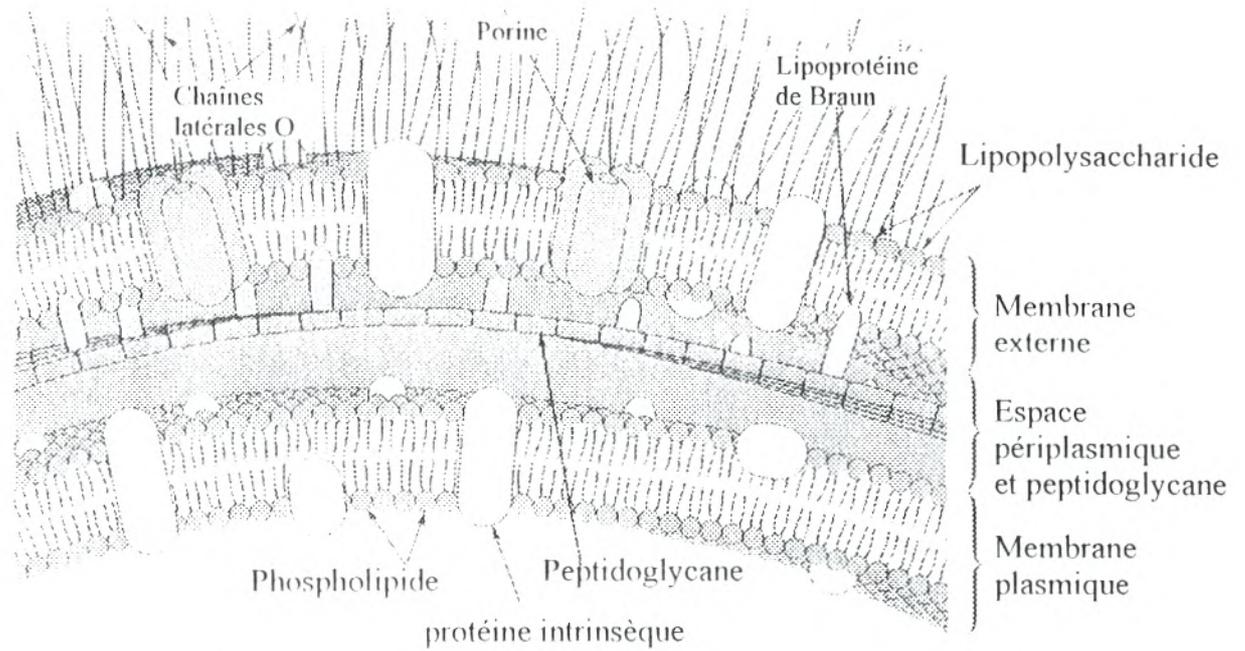
Les chaînes de peptidoglycane sont reliées entre elles par des liaisons interpeptidiques. Le résultat est un énorme sac de peptidoglycane qui est en fait un réseau dense de polymères interconnectés.

III.1.2- Biosynthèse du peptidoglycane

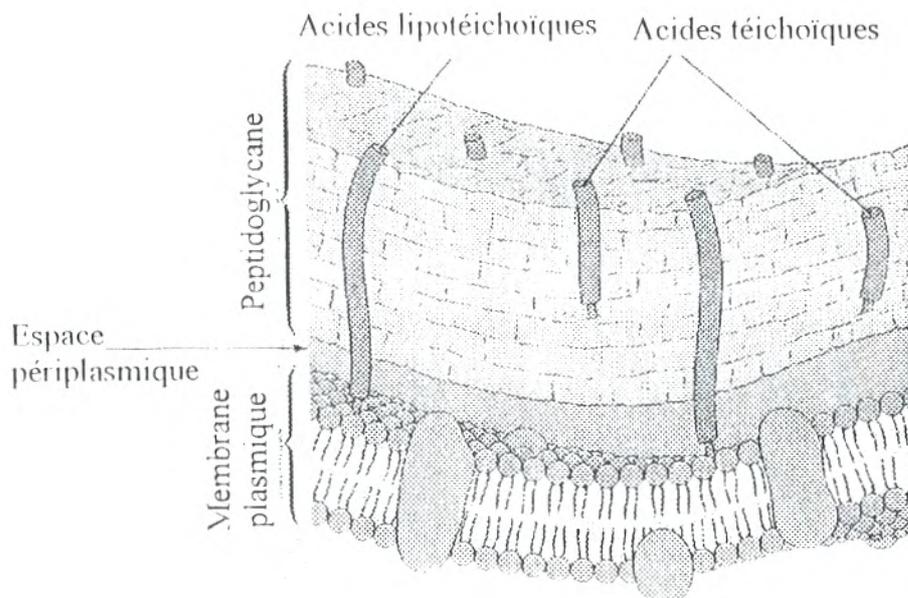
Le peptidoglycane est synthétisé quand la bactérie s'accroît, s'allonge et se divise. Sa biosynthèse s'effectue en trois stades.

A titre d'exemple la biosynthèse du peptidoglycane chez *Staphylococcus aureus* s'effectue comme suit [PELLON et NADJIOULLAH, 1992] :

- Au cours de l'étape cytoplasmique : les précurseurs nucléotidiques des dérivés de D-glucosamine sont synthétisés ainsi que le segment peptidique, ce qui aboutit à la formation du précurseur du peptidoglycane l'UDP acétyl-muramyl-pentapeptide (UDP-NAM-P).



Enveloppe des bactéries Gram - négatives



Enveloppe des bactéries Gram - positives

Figure 11 : La paroi cellulaire des bactéries à Gram négatif et à Gram positif (d'après PRESCOTT, HARLEY et KLEIN, 1993)

- Dans la membrane : ce composé est pris en charge par un transporteur lipidique ; le passage du composé UDP-NAM-P précédemment formé du cytoplasme vers la paroi s'accompagne de la fixation du N-acétylglucosamine et de pentaglycine.

- Au niveau de la paroi : commence la polymérisation, elle est catalysée par des enzymes dites protéines de liaison aux pénicillines ou P.L.P, et s'effectue en deux étapes : formation de liaisons osidiques entre les fragments glucidiques, réaction catalysée par des transglycosylases ; ensuite des transpeptidases réalisent des ponts interpeptidiques assurant la réticulation du peptidoglycane. La réaction de transpeptidation libère la D-Alanine (D-Ala) terminale du pentapeptide et forme un pont entre la D-Ala terminale et la glycine terminale d'une pentaglycine. D'autres enzymes : les D-D-peptidases contrôlent le degré de réticulation du peptidoglycane.

III.2- Action des β -lactames

Les P.L.P sont les cibles bactériennes des β -lactames. Elles sont classées selon leurs poids moléculaire en :

- P.L.P de haut poids moléculaire sont le plus souvent des enzymes bifonctionnelles : transglycosylase/transpeptidase. Ce sont des P.L.P essentiels pour le maintien de l'intégrité cellulaire. Leur inhibition conduit souvent à une lyse de la bactérie par intervention du système autolytique. [NAJIOULLAH et al., 1993]. Ces dernières sont au nombre de quatre : P.L.P1A, P.L.P1B, P.L.P2, P.L.P 3.

- P.L.P de faible PM sont des carboxypeptidases, elles ne semblent pas impliquées de façon prépondérante dans l'effet antibactérien des β -lactames [BRION et HUET, 1992]

Dans le modèle proposé par Stominger en 1965, la pénicilline agirait par analogie structurale avec le dipeptide D-Ala-D-Ala terminal du pentapeptide qui constitue le substrat naturel des transpeptidases et accessoirement des carboxypeptidases et la structure du noyau β -lactame [VANDENESCH et ETIENNE 1997].

Cette action commune aux β -lactames bicycliques et monocycliques utilise le schéma classique :



S : substrat : acyl D- Ala-D-Ala

E : enzyme P.L.P

E-S : complexe enzyme – substrat

ES* : complexe activé

P : peptidoglycane

Le β -lactame S' reconnu par l'enzyme s'y fixe de manière réversible et bloque son fonctionnement normal (figure 13).



S' : β -lactame

Si les mécanismes d'action des systèmes bicycliques s'appliquent aux systèmes monocycliques, il existe néanmoins quelques différences significatives concernant l'affinité des monobactames pour les enzymes cibles. Les P.L.P 1A, 4, 5 et 6 d'*E.coli* présentent une grande affinité vis-à-vis des monobactames naturels dont le SQ 26,180. En revanche l'affinité de l'aztréonam pour la P.L.P 3 des germes à Gram négatif est très forte. Cette sélectivité explique l'effet morphologique observé chez les bactéries qui deviennent filamenteuses [GEORGEOPAPADAKOU et al., 1982]

III.3- Bactériolyse secondaire

La fixation des β -lactames sur les P.L.P conduit au blocage de la biosynthèse du peptidoglycane, cette action est bactériostatique. Elle est souvent suivie d'une seconde phase irréversible qui aboutit à la mort de la bactérie suite à l'activation du système autolytique c'est l'effet bactéricide [TOMASZ, 1979]. En présence de l'antibiotique les autolysines sont libérées et hydrolysent la liaison entre le pentapeptide et l'enchaînement NAM-NAG ce qui aboutit à une désorganisation du peptidoglycane et à un effet léthal.

Deux hypothèses sont émises pour expliquer la lyse bactérienne :

- Levée du contrôle négatif par libération des acides lipotéichoïques et activation des autolysines [TOMASZ, 1980]
- Création d'un déséquilibre entre une synthèse du peptidoglycane ralentie (action des β -lactames) et une destruction par les autolysines continuant à un rythme normal [TANKOVIC et DUVAL, 1997]

III.4- Résistance aux β -lactames

Les principaux mécanismes de résistance aux β -lactames sont classés en 3 catégories :

- Défaut de pénétration des β -lactames dans la bactérie
- Défaut d'affinité entre la cible bactérienne, les P.L.P, et l'antibiotique.
- Inactivation ou excrétion par des systèmes enzymatiques

III.4.1- Défaut de pénétration des β -lactames dans la bactérie

Avant d'atteindre sa cible, l'antibiotique doit diffuser à travers la paroi bactérienne, la composition de la paroi, variable suivant la nature de la bactérie, déterminera pour une part la sensibilité de la bactérie aux β -lactames.

Chez les bactéries à Gram positif, la pénétration est en général aisée car le peptidoglycane constituant essentiel de la paroi n'est pas une barrière pour des molécules aussi petites que les β -lactames [BIAND M.Y., 1986].

En revanche chez les bactéries à Gram négatif, la structure de la paroi formée de lipopolysaccharides (L.P.S) constitue une barrière aux antibiotiques hydrophobes et/ou de masse moléculaire élevée [JARLIER V., 1997]. Par contre les substances hydrophiles et de masse moléculaire faible comme les β -lactames empruntent la voie constituée par les porines, leur nombre, leur nature ainsi que leur diamètre déterminent le niveau de résistance du microorganisme. Des travaux effectués sur *P. aeruginosa* et *E.coli* ont montré que la forte résistance de ces germes aux β -lactames est essentiellement due à une faible pénétration de l'antibiotique à travers la membrane externe [ZIMMERMANN 1977 ; 1978, 1980] ; [GODFREY et al., 1981].

Le passage des β -lactames à travers la paroi bactérienne est d'autant plus aisé que l'antibiotique est de faible PM, hydrophile et se comporte comme un cation [BRIAND M.Y., 1986].

III.4.2- Déficit d'affinité entre les P.L.P. et l'antibiotique

De nombreuses espèces bactériennes ont développé une résistance aux β -lactames par modification de l'affinité de leurs cibles primaires. Ce mécanisme est généralement retrouvé chez les bactéries à Gram positif. Ce type de résistance met en jeu des modifications de nature qualitative ou quantitative [VANDENESCH et ETIENNE, 1997] :

1- Modification quantitative : il s'agit d'une modification de l'expression des P.L.P habituellement produites avec hyper-expression de P.L.P possédant naturellement une faible affinité pour les β -lactames : cas des entérocoques [JARLIER V., 1997]

2- Modification qualitative : due à l'acquisition d'une P.L.P additionnelle d'origine exogène. Il est admis actuellement qu'il s'agit là d'une résistance intrinsèque qui provient essentiellement de l'expression d'une P.L.P particulière la PLP2' ou 2a retrouvé dans l'ensemble des souches de staphylocoques résistants à la méthicilline [NAJIOULLAH et al., 1989]

III. 4.3- Inactivation par des systèmes enzymatiques

L'inactivation enzymatique par hydrolyse des β -lactames est de loin le mécanisme de résistance bactérienne le plus fréquent [PHILIPPON et al., 1991].

Les β -lactamases peuvent rendre inactifs les antibiotiques par deux mécanismes :

1- Action hydrolytique des β -lactames : les β -lactamases agissent sur les β -lactames suivant une cinétique qui n'est pas différente de celle des P.L.P, elles inactivent l'antibiotique par ouverture du cycle β -lactame par rupture de la liaison amide [SOUGAKOFF W., 1991]

2- Action non-hydrolytique des β -lactames : dans certains cas et en présence de β -lactames très résistants à l'hydrolyse comme l'aztréonam, certaines β -lactamases peuvent entraîner une résistance par des mécanismes

non-hydrolytiques. Ces β -lactamases, grâce à une surproduction peuvent rendre l'antibiotique inactif en le séquestrant sans hydrolyse, l'empêchant ainsi d'atteindre sa cible [JARLIER V., 1997]

2^{ÈME} PARTIE :

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I- Matériel

I.1- Matériel biologique

Le matériel biologique a été soigneusement choisi.

Les souches de *Pseudomonas*, *E. Coli* ainsi que Entérocoque et Staphylocoque ont été essentiellement choisis pour :

- Les différences de la structure de la paroi bactérienne.
- Les problèmes potentiels qu'ils posent en clinique et le défi qu'ils opposent à l'antibiothérapie moderne.

Ces quatre souches proviennent des laboratoires de microbiologie de l'Institut des sciences de la nature de Tlemcen.

Elles ont toutes fait l'objet d'études antérieures mais nous avons jugé nécessaire de leur faire subir quelques examens pour confirmer leur appartenance au genre.

I.2- Milieu de culture :

Pour évaluer l'activité antibactérienne des monobactames de synthèse, nous avons utilisé le milieu Mueller-Hinton (MH) de l'Institut Pasteur d'Algérie. Ce milieu est recommandé et standardisé pour l'étude de l'activité des antibiotiques.

Sa composition est la suivante [CARBONNELLE et al, 1987]

- Infusion de viande de bœuf. 300g
- Hydrolysat de caséine. 17,5g
- Amidon. 1,5g
- Eau distillée qsp. 1L

Le pH est ajusté à 7,4. Le milieu est stérilisé par autoclavage à 120°C pendant 20mn, il peut être solidifié par addition d'agar à raison de 15g/L.

I.3- Monobactames de synthèse :

Les monobactames de synthèse utilisés dans ce travail proviennent du laboratoire de chimie organique du département des sciences exactes de

l'université ABOU-BEKR BELKAID de Tlemcen. Leur synthèse a fait l'objet du mémoire de magister de Melle BELABDELLI Fouzia 1996 dirigée par Mr KAJIMA M. Les produits F, NF, A, T, H, BHF, 1', BHA et BHC utilisés, et dont les formules chimiques sont représentées dans la figure 14, correspondent respectivement aux produits 109, 111, 113, 114, 115, 116, 118, 120 et 122 du dit-mémoire.

II- Méthodes

II.1- Préparation de la préculture :

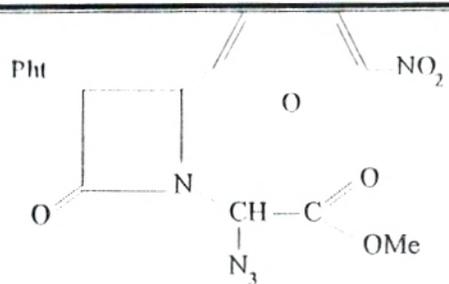
A partir d'une culture pure en boîte de Pétri, on ensemence quatre tubes contenant chacun 6 ml de milieu M.H. par :

- 1 à 2 colonies bien isolées et identiques d'*E.Coli*
- 1 colonie de *P. aeruginosa*
- 3 à 4 colonies de Staphylocoques
- 4 à 5 colonies d'Entérocoque

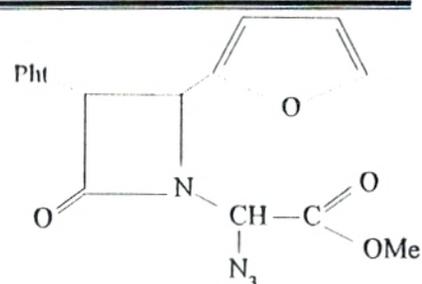
On incube 4 à 5 heures au bain-marie va et vient à $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ afin d'obtenir une culture d'opacité voisine de celle de 16 à 18h. La mesure des densités optiques (D.O) des précultures par spectrophotométrie à 600 nm donne :

- Pour *E. Coli* une D.O de 0,23
- Pour *P. aeruginosa* elle est d'environ 0,07
- Pour Staphylocoque de 0,14
- Pour l'Entérocoque de 0,14

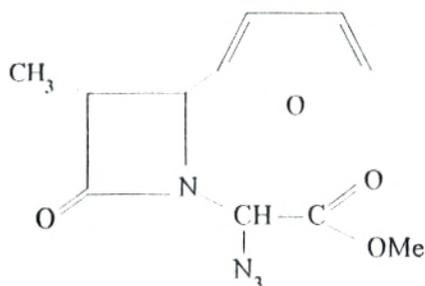
Ces D.O titrent pour un nombre de germes équivalent à 10^6 UFC/ml.



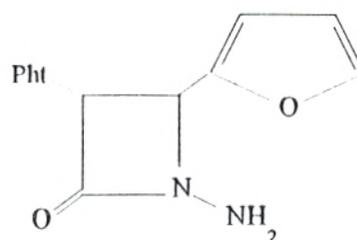
NF : 1 [α - azido - α - méthoxycarbonyl] méthyl
3- phthalmido 4 - [5 - nitrofuryl] azétidine 2 - one



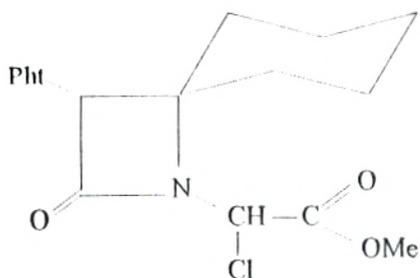
F : 1 [α - azido - α - méthoxycarbonyl] méthyl
3- phthalmido 4 - furyl - azétidine 2 - one



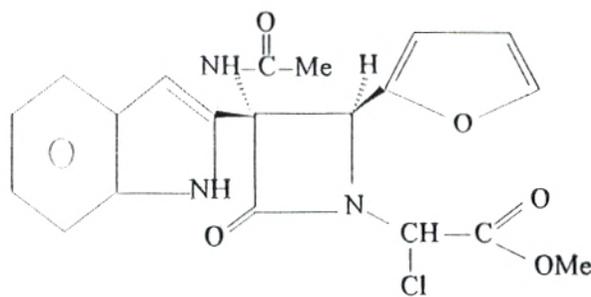
A : 1 [α - azido - α - méthoxycarbonyl] méthyl
3- méthyl 4 - furyl - azétidine 2 - one



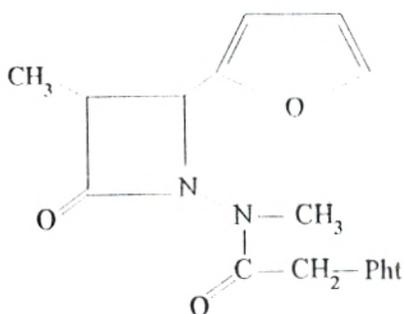
I : 1 - amino - 3 phthalmido 4 - furyl azétidine - 2 one



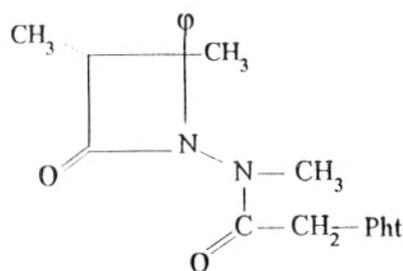
H : 1 [α - chloro - α - méthoxy carbonyl] méthyl
3- phthalmido 4 - cyclo hexyldényl azétidine 2 - one



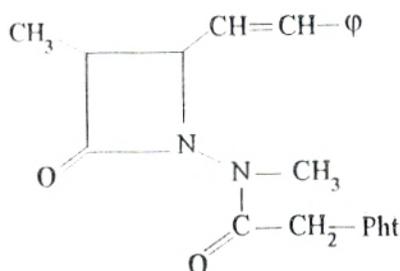
T : 1 [α - chloro - α - méthoxy carbonyl] méthyl
3- indoyl - 3 acétamido 4 - furyl - azétidine 2 - one



BHF : 1 [N - méthyl- N - phthalmido acétyl] amino
3- méthyl - 4 - furyl - azétidine 2 - one



BHA : 1 [N - méthyl - N - phthalmido acétyl]
amino - 3- méthyl - 4- phényl - 4 méthyl
- azétidine 2 - one



BHC : 1 [N - méthyl - N - phthalmido acétyl] amino - 3- méthyl - 4- styryl - azétidine 2 - one

*Fig 1 : Les formules chimiques
des molécules de synthèse*

II.2- Evaluation de l'activité antibactérienne des monobactames de synthèse :

II.2.1- Méthode de diffusion sur gélose

Principe :

Lorsqu'un disque imprégné d'antibiotique est placé sur une gélose préalablement inoculée avec la bactérie testée, il s'humidifie et l'antibiotique diffuse radialement du disque dans la gélose en formant ainsi un gradient de concentration.

L'antibiotique est présent en fortes concentrations à proximité du disque et affecte des micro-organismes même faiblement sensibles. Plus on s'écarte du disque, plus la concentration en antibiotique diminue. Après incubation, une zone ou un halo clair est présent [PRESCOTT, HARLEY, KLEIN, 1993]

Mode opératoire :

A partir d'une préculture de 10^6 UFC/ml, on prépare des dilutions dans de l'eau physiologique stérile. Les solutions inoculées par *E.coli* et *P. aeruginosa* sont diluées au $1/10000^{\text{ème}}$ par contre celles du Staphylocoque et Entérocoque sont diluées au $1/100^{\text{ème}}$.

Les boîtes de Pétri contenant du milieu MH sont inondées, après 10mn le surplus est éliminé et des disques imprégnés de la solution-mère d'antibiotique sont déposés à la surface de la gélose. Les disques doivent adhérer à la surface de la gélose et être disposés de telle façon que les zones d'inhibition ne chevauchent pas.

Après un temps de prédiffusion de l'antibiotique dans la gélose de 30mn à la température ambiante, les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24h. La lecture des résultats se fait par mesure des diamètres des zones d'inhibition.

II.2.2- Méthode de dilution

Principe :

Dans la méthode de dilution en bouillon, on prépare une série de tubes de bouillon (habituellement du MH) contenant des dilutions sérielles d'un antibiotique et on l'inocule avec une population standard de l'organisme testé.

Une lecture de la densité optique à 600nm effectuée après 18 à 24h d'incubation à 37°C permet de déterminer les concentrations efficaces qui parviennent à inhiber l'inoculum bactérien [BILE J., 1992] ; [PRESCOTT, HARLEY, KLEIN ; 1993]

Mode opératoire :

Dans une série de tubes à essai contenant chacun 6ml de milieu MH liquide, on ajoute des concentrations croissantes du produit de synthèse allant de 30 à 150mg/ml. Pour chaque série, deux tubes témoins sont ajoutés :

- L'un ne contenant pas de produits de synthèse
- L'autre contenant de l'aztréonam (la concentration choisie correspond à la CMI de chaque germe).

Tous ces tubes sont inoculés avec 0,1ml d'une préculture contenant un nombre de bactéries égales à 10^6 UFC/ml. Après homogénéisation, une lecture de la D.O est effectuée elle correspond à la DO à $t = 0$. Les tubes sont ensuite incubés à 37°C pendant 18h. Au terme de cette incubation, une seconde lecture de la D.O est réalisée

II.3- Détermination des CMI

Principe :

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est la concentration la plus faible d'un antibiotique capable d'inhiber la croissance bactérienne après un temps de contact de 16 à 18h [PRESCOTT, HARLEY, KLEIN ; 1993]

La CMI est la valeur la plus utilisée pour caractériser l'efficacité d'un antibiotique sur une bactérie [BRIAND M.Y., 1986]



Mode opératoire :

La CMI est déterminée par la méthode de dilution en milieu liquide.

II.4- Effet morphologique :

Pour mettre en évidence la ou les P.L.P cibles de l'antibiotique une étude de l'effet morphologique est effectuée sous microscopie optique. Pour notre cas, une coloration de Gram est effectuée pour visualiser l'état des bactéries aux concentrations subinhibitrices de chaque substance de synthèse vis-à-vis de chaque germe.

II.5- Reproductibilité des résultats :

Un bon agent antimicrobien ne doit pas seulement être efficace et avoir une activité stable sur le germe testé mais il doit aussi reproduire le même effet lors des répétitions des tests dans les mêmes conditions de culture. Dans cette optique, les tests de susceptibilité en milieu liquide sont répétés plusieurs fois dans les mêmes conditions afin de vérifier la reproductibilité des résultats obtenus.

3^{ÈME} PARTIE :
RÉSULTATS ET
INTERPRÉTATIONS

1- Evaluation de l'activité antibactérienne des monobactames de synthèse

L'évaluation de l'efficacité d'un agent antimicrobien débute souvent par un test d'évaluation destiné à vérifier si les agents sont efficaces et à quelles concentrations. Cette première évaluation peut être suivie par une analyse dans des conditions plus réelles et proches des conditions d'utilisation [PRECOTT, HARLEY, KLEIN, 1994]. Dans notre cas, les tests d'évaluation de l'activité antibactérienne des monobactames de synthèse sur les quatre souches choisies ont été réalisés suivant les deux méthodes les plus classiques à savoir :

- La méthode de diffusion sur gélose.
- La méthode de dilution sur milieu liquide.

1.1- Par la méthode de diffusion sur gélose

Cette méthode reste une méthode qualitative d'évaluation du pouvoir antibactérien des monobactames de synthèse. Les résultats obtenus par cette méthode sont résumés dans le tableau 4. A priori, on peut distinguer deux groupes de produits :

- Le premier groupe comprend les produits qui n'ont exercé aucune activité sur les souches utilisées Gram positives ou Gram négatives.
- Le deuxième groupe est celui des produits qui ont montré un certain pouvoir antibactérien vis-à-vis des souches à Gram négatif comme celles à Gram positif. Les zones d'inhibition varient considérablement, de 20 et 25mm pour le produit NF respectivement sur le Staphylocoque et *E. coli*, à 4mm pour le produit A sur *E.coli*. Notons que les disques utilisés dans cette méthode sont imbibés de la solution-mère de chaque monobactame de synthèse.

Les zones d'inhibition obtenues restent très insuffisantes par rapport à la concentration très élevée de monobactames de synthèse utilisée.

Rappelons ici que cette méthode repose sur la diffusion du produit radialement du disque dans la gélose. Cela suppose l'antibiotique hydrophile ;

Tableau 4 : Diamètres des zones d'inhibition évalués par la méthode de diffusion sur gélose (diamètres en mm)

<i>Monobactames</i> <i>Souches bactériennes</i>	<i>NF</i>	<i>F</i>	<i>A</i>	<i>I'</i>	<i>T</i>	<i>H</i>	<i>BHA</i>	<i>BHC</i>	<i>BHF</i>
Staphylocoque	25	8	13	7	9	10	-	-	-
Entérocoque	-	9	8	-	-	-	-	-	-
E. Coli	20	7	-	-	4	-	-	-	-
Pseudomonas	-	-	13	7	-	-	-	-	-

- Absence de zone d'inhibition

or le caractère hydrophile dépend du degré de polarité de chaque molécule, ce dernier, étant différent d'un produit à un autre, expliquerait peut être l'hétérogénéité des résultats obtenus.

1.2- Par la méthode de dilution en milieu liquide :

L'activité antibactérienne des monobactames de synthèse estimée par cette méthode doit prendre en considération non seulement le cycle β -lactame (siège de cette activité) mais aussi les différents groupements greffés sur celui-ci. Ainsi les groupements greffés en N-1 répartissent les produits de synthèse en 3 groupes principaux :

- ❖ Le groupe de produits ayant un groupement carbonyle en N -1, ce groupe comprend les produits NF, F, A, H et T.
- ❖ Le groupe ayant une fonction amino en N-1, comprend un produit unique le produit 1'.
- ❖ Le groupe des produits ayant un azote substitué en N-1 ce sont les produits BHA, BHC et BHF.

A partir des D.O lues après 18 à 24heures d'incubation des pourcentages d'inhibitions sont calculés par rapport au témoin ne contenant pas de produit de synthèse. Une moyenne est calculée à partir de ces données à différentes concentrations (voir annexe).

1.2.1- Effet des monobactames sur les souches à Gram négatif :

1.2.1.1- Action sur *P. aeruginosa* :

Les monobactames les plus actifs sur cette souche sont : NF,F,T,A,1' ; leurs effets sont représentés par les figures 15,16,17,18 et 19 respectivement.

Les taux d'inhibition de la croissance bactérienne de cette souche varient de 65% pour le T à 100% pour le NF et 1' à la concentration de 120 μ g/ml. A 90 μ g/ml l'activité antibactérienne des produits NF, F et T est plutôt faible, la moyenne des taux d'inhibition calculée n'excédant pas 30%. Les produits A et 1' se montrent les plus actifs réalisant des taux d'inhibition respectifs de 69 et 92% de la croissance bactérienne à la même concentration.

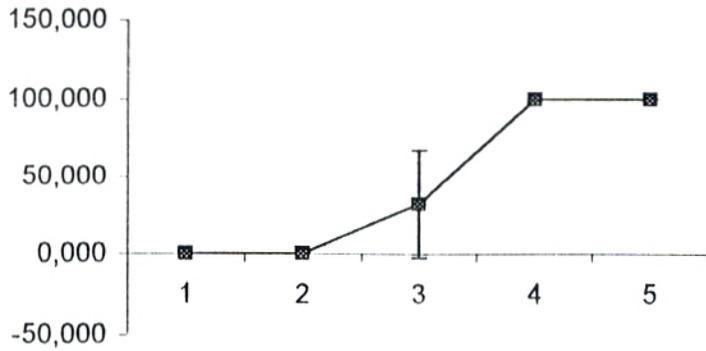


Figure 15 : Activité antibactérienne du produit NF sur la croissance bactérienne du Pseudomonas exprimée en Pourcentage d'inhibition

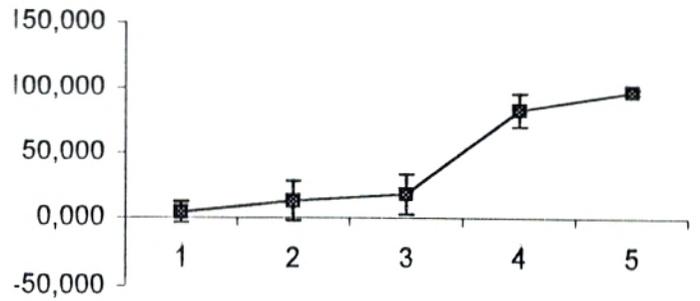


Figure 16: Activité antibactérienne du produit F sur la croissance bactérienne du Pseudomonas exprimée en Pourcentage d'inhibition

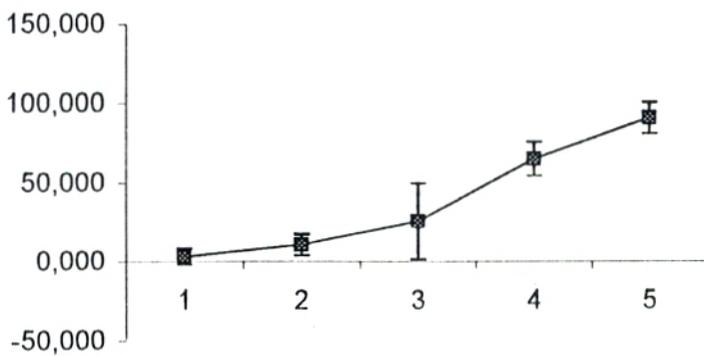


Figure 17 : Activité antibactérienne du produit T sur la croissance bactérienne du Pseudomonas exprimée en Pourcentage d'inhibition

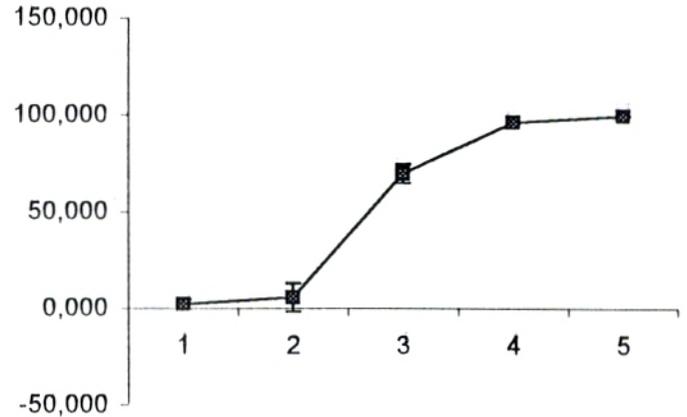


Figure 18 : Activité antibactérienne du produit A sur la croissance bactérienne du Pseudomonas exprimée en Pourcentage d'inhibition

Le produit H, quant à lui, constitue une exception dans ce groupe puisqu'il ne détermine que 27% d'inhibition de la croissance bactérienne du *Pseudomonas* à 150 µg/ml (figure 20)

Ces résultats confirment le pouvoir antibactérien des produits ayant un groupement carbonyle en N-1 sur le *Pseudomonas*.

BONNER et SKYES, 1984 rapportent que certaines molécules d'azédidinones activées par un groupement carbonyle en N-1 du cycle β -lactame montrent un haut niveau d'activité contre le *Pseudomonas*.

L'efficacité des produits sus-cités pourrait être améliorée par des groupements polaires greffés en C-3 et C-4. Cette polarité doit faciliter la pénétration de ces produits à travers la membrane externe de la paroi du *Pseudomonas* pour atteindre leur cible. Ceci concorde avec les données bibliographiques qui rapportent qu'en général, une augmentation de l'hydrophobicité de la molécule tend à diminuer la vitesse de diffusion, ce qui est le cas du produit H dont les groupements non polaires greffés en C-3 et C-4 sont peut-être responsables de la diminution significative de l'activité par diminution de la diffusion de ce produit à travers la membrane externe du *Pseudomonas* et vice-versa.

Les résultats de l'activité antibactérienne du produit I' ayant une fonction amino en N-1 sont très encourageants. Ce résultat pourrait être dû à la présence du groupement NH_2 en N-1, en effet selon HAYES et WARD, 1986, la présence d'une charge positive améliore la diffusion à travers les porines ; des études effectuées sur *E.coli* ont montré qu'une charge positive additionnelle accélère la diffusion à travers les porines OmpF et OmpC.

Les produits BHA et BHC sont de faibles inhibiteurs de la croissance du *Pseudomonas* avec des taux d'inhibition n'excédant pas 40% à 150 µg/ml. La faible polarité des différents groupements greffés sur le noyau de ces deux produits pourrait être à l'origine de ce faible effet.

1.2.1.2- Action sur *E.coli* :

En comparant l'action inhibitrice des différents produits sur *E.coli* avec ceux obtenus sur le *P. aeruginosa*, on remarque que ces produits ne sont

pas aussi performants qu'ils l'étaient sur la première souche Gram négative, d'inhibition calculé.

en effet, les pourcentages d'inhibitions obtenus pour les produits NF, F et A n'excèdent pas les 65% à 150 µg/ml (figures 21, 22 et 23). Le produit H, quant à lui, est un peu plus performant sur E.coli qu'il ne l'a été sur Pseudomonas réalisant un taux d'inhibition de 40% à 150µg/ml (figure 24).

Ces résultats ne sont pas encourageants d'autant plus que selon BONNER et SKYES, 1984 les monobactames ayant un groupement carbonyle activateur possède en général une bonne activité contre les entérobactéries. Ceci pourrait s'expliquer par la haute résistance de cette souche démontrée par les résultats de l'antibiogramme .

Cette souche est résistante à la plupart des antibiotiques utilisés. L'un des facteurs majeurs qui peut expliquer cette résistance est la barrière de perméabilité qu'oppose cette souche face aux antibiotiques.

En effet, des entérobactéries, sélectionnées pour leur résistance aux quinolones, ont été trouvées peu sensibles à quelques aminoglycosides, β - lactames, chloramphénicol et tétracycline. Ce type de résistance était associé à un changement de la perméabilité de la membrane externe [GRAYSON et ELIOPOULOS, 1990].

L'action antibactérienne des produits BHA, BHC et BHF sur les deux souches Gram négatives reste moins importante en comparaison avec celle des autres produits. En effet, les taux d'inhibitions ne dépassent pas 51%, 37% et 36% respectivement pour les produits BHC, BHA et BHF à 150µg/ml.

1.2.2- Effet des monobactames sur les souches à Gram positif :

Les figures 25, 26, 27, 28 et 29 résument les résultats de l'activité antibactérienne des produits NF, F, H, A et I' sur la souche de Staphylocoque testée.

On constate que les produits NF et I' se montrent très particulièrement efficaces, ils inhibent la croissance totale du Staphylocoque à 90µg/ml, les produits A et F se montrent moins performants que les précédents, ils

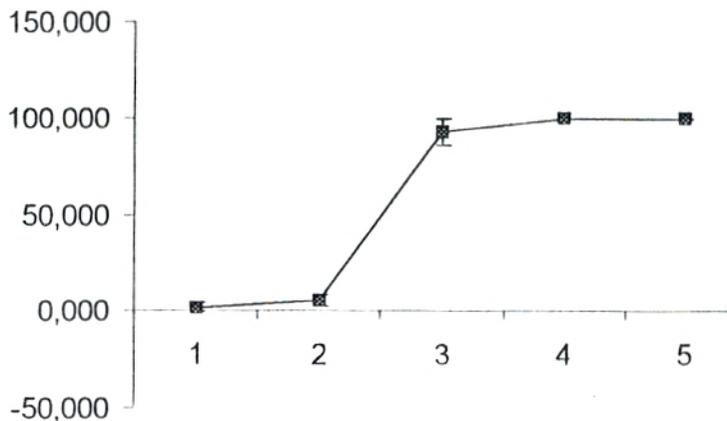


Figure 19 : Activité antibactérienne du produit L sur la croissance bactérienne du Pseudomonas exprimée en Pourcentage d'inhibition

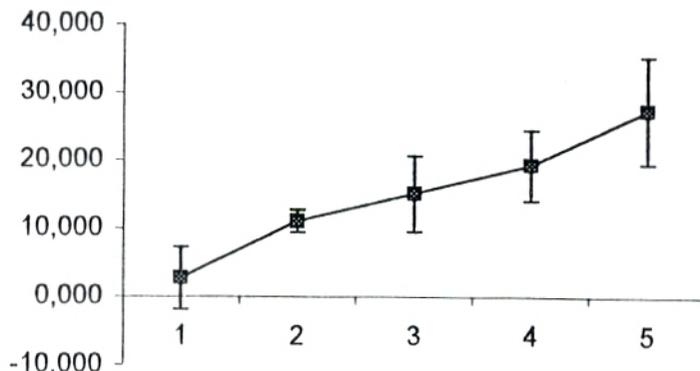


Figure 20: Activité antibactérienne du produit H sur la croissance bactérienne du Pseudomonas exprimée en Pourcentage d'inhibition

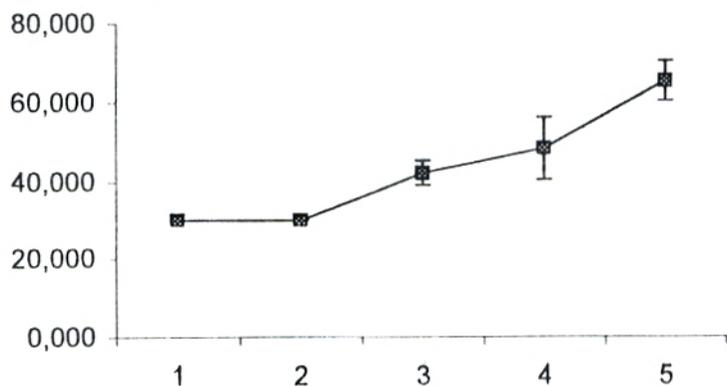


Figure 21 : Activité antibactérienne du produit NF sur la croissance bactérienne d'E. coli exprimée en Pourcentage d'inhibition

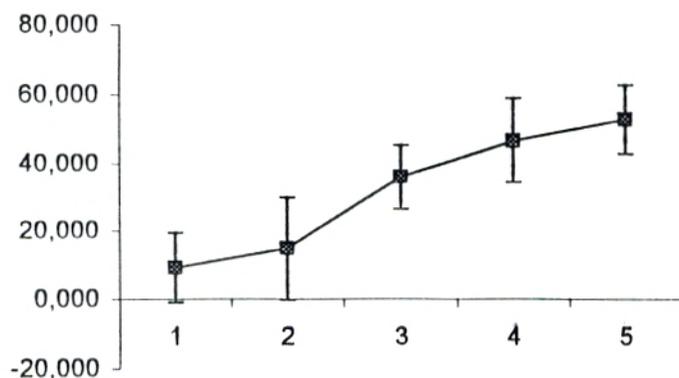


Figure 22: Activité antibactérienne du produit F sur la croissance bactérienne d'E. coli exprimée en Pourcentage d'inhibition

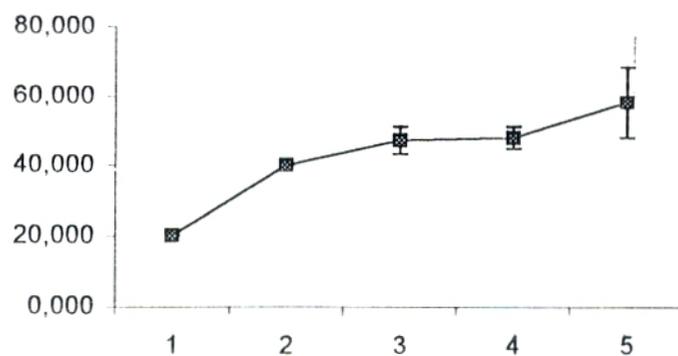


Figure 23 : Activité antibactérienne du produit A sur la croissance bactérienne d'E. coli exprimée en Pourcentage d'inhibition

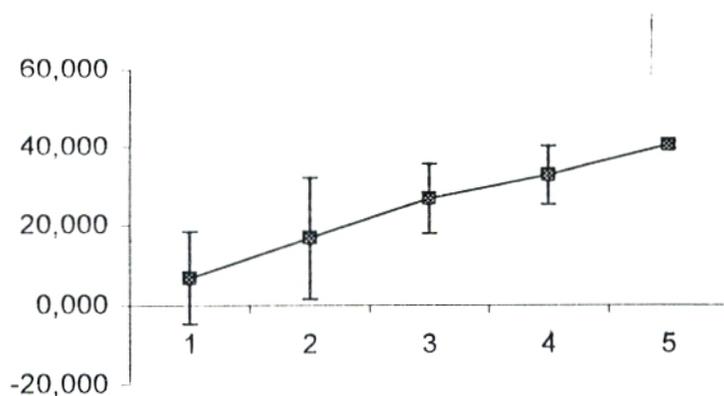


Figure 24: Activité antibactérienne du produit H sur la croissance bactérienne d'E. coli exprimée en Pourcentage d'inhibition

atteignent à peu près 95% d'inhibition de la croissance bactérienne du Staphylocoque à 150µg/ml.

Un cas particulier est enregistré pour les produits T et H. En effet, le produit T, qui était actif sur les deux souches à Gram négatif, se retrouve dans le cas du Staphylocoque faiblement inhibiteur de sa croissance bactérienne avec un taux d'inhibition de 59% à 150µg/ml (figure 30). Par contre le produit H, dont les taux d'inhibition n'excédaient pas les 40% pour les cas précédents, inhibe plus de 85% de la croissance du Staphylocoque à 90µg/ml, cette inhibition devient totale à 120µg/ml.

La faible polarité du produit H, qui représentait un handicap à sa diffusion à travers la paroi des Gram négatif, offre dans le cas des Gram positifs un avantage qui facilite sa pénétration à travers la structure réticulée du peptidoglycane.

Le produit BHA affecte très peu la croissance normale du staphylocoque puisque à 150µg/ml on n'enregistre qu'un taux de 16% d'inhibition. Quand au produit BHF, la présence du groupement furyle améliore considérablement son rendement puisqu'on obtient une inhibition totale de la croissance bactérienne de cette souche à 150µg/ml (figure 31).

Sur l'Entérocoque, les produits porteurs d'un groupement carbonyle en N-1 se montrent aussi actifs qu'ils ont été sur le Staphylocoque avec des taux d'inhibition compris entre 63% pour le produit T et 100% pour les produits NF et BHF, les figures 32, 33, 34,35 et 36 représentent l'effet antibactérien des produits NF, F, T, BHC et BHF relatifs à cette souche respectivement.

1.2.3- Conclusion :

Au terme de cette série d'essais effectués par la méthode de dilution, on peut dire que tous les produits de synthèse testés exercent une inhibition de la croissance bactérienne contrairement à ce qui a été observé auparavant avec les résultats de la méthode de diffusion. Cependant certains produits affectent la croissance plus que d'autres. Cela pourrait être dû aux différentes substitutions greffées sur le cycle β -lactame.

Il faut souligner ici :

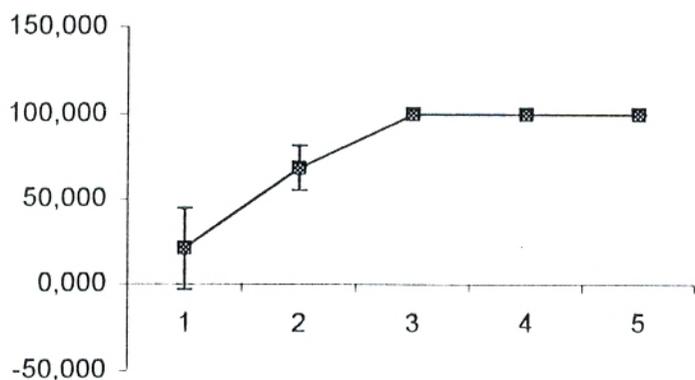


Figure 25 : Activité antibactérienne du produit NF sur la croissance bactérienne du Staphylocoque exprimée en Pourcentage d'inhibition

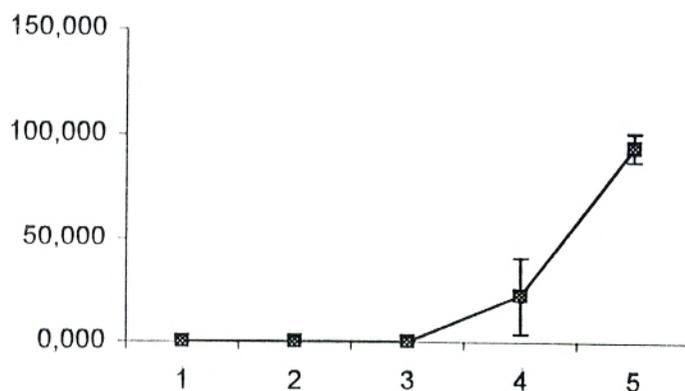


Figure 26: Activité antibactérienne du produit F sur la croissance bactérienne du Staphylocoque exprimée en Pourcentage d'inhibition

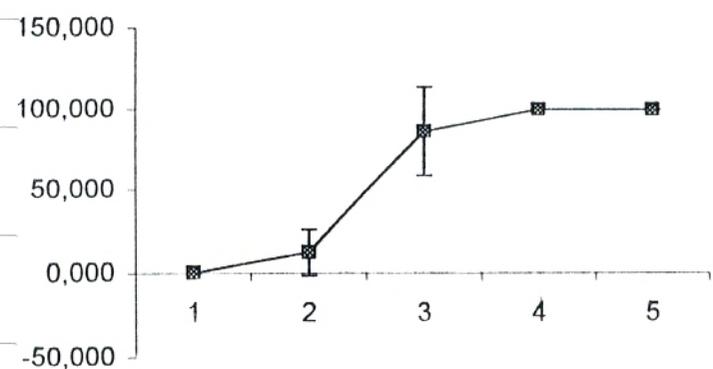


Figure 27 : Activité antibactérienne du produit H sur la croissance bactérienne du Staphylocoque exprimée en Pourcentage d'inhibition

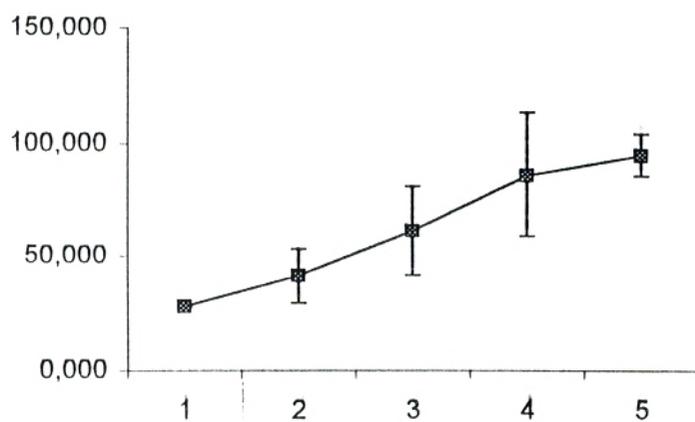


Figure 28: Activité antibactérienne du produit A sur la croissance bactérienne du Staphylocoque exprimée en Pourcentage d'inhibition

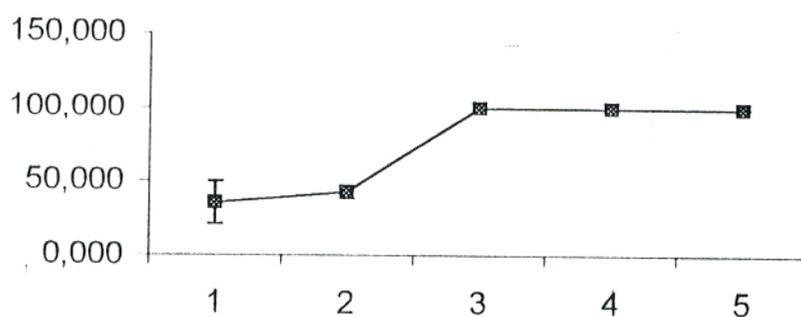


Figure 29 : Activité antibactérienne du produit 1 sur la croissance bactérienne du Staphylocoque exprimée en Pourcentage d'inhibition

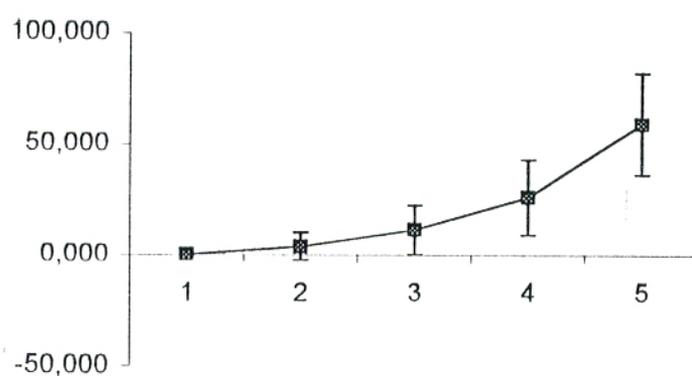


Figure 30: Activité antibactérienne du produit T sur la croissance bactérienne du Staphylocoque exprimée en Pourcentage d'inhibition

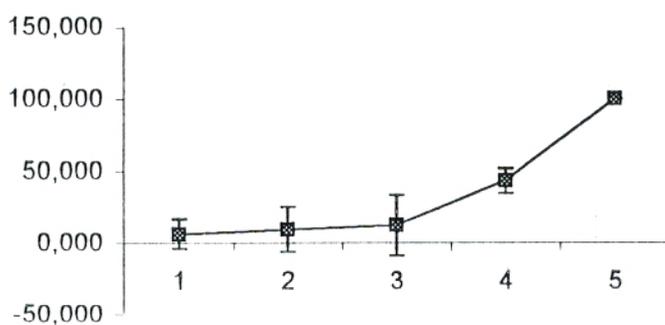


Figure 31: Activité antibactérienne du produit BHF sur la croissance bactérienne du Staphylocoque exprimée en Pourcentage d'inhibition

-
- L'efficacité des groupements carbonyle et amino activateurs de la molécule β -lactame.
 - L'efficacité de la substitution du groupement furyle, la comparaison qui élucide le mieux l'intérêt de cette substitution concerne les produits BHA, BHC et BHF qui ne diffèrent que par leur substitution en C-4 ; la présence du groupement furyle sur le BHF le rend plus actif que les deux autres dans la plupart des cas.
 - La substitution par le groupement nitrofuryle retrouvée sur le NF le rend actif aussi bien sur les Gram négatifs que sur les Gram positifs. L'utilisation en clinique de ce groupement a donné naissance à une nouvelle famille d'antibiotiques : les nitrofuranes dont le représentant principal est la nitrofurantoïne. Ces derniers ont démontré leurs grande efficacité à lutter contre les infections et notamment les infections urinaires [SCHORDERET et al., 1992]
 - L'association du groupement amino en N-1 et du groupement furyle en C-4 a donné le produit 1' ; les résultats de ce dernier sont comparables à ceux du produit NF aussi bien sur les Gram positifs que sur les Gram négatifs.
 - En comparant les résultats des produits H et T possédant la même substitution en N-1, on remarque que le produit H est actif sur les souches Gram positives alors qu'il l'est moins sur les Gram négatives. Le cas contraire est observé pour le produit T. Cette différence d'effet due à la polarité concorde avec des travaux antérieurs qui rapportent que l'adaptation aux porines obtenues par élévation de l'hydrophilie a souvent pour conséquence la diminution ou la suppression d'activité sur les germes à Gram positif [BRIOND et HUET, 1992].

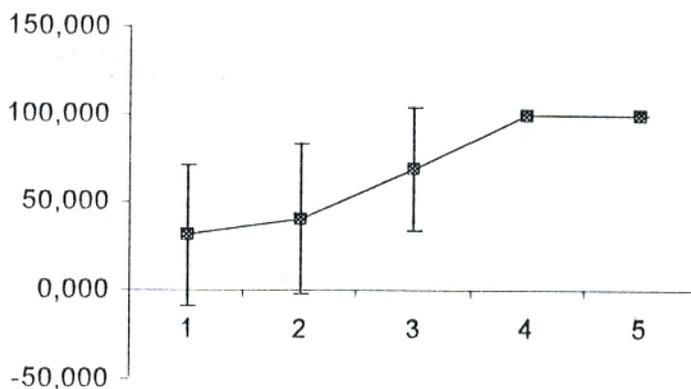


Figure 32 : Activité antibactérienne du produit NF sur la croissance bactérienne de l'Entérocoque exprimée en Pourcentage d'inhibition

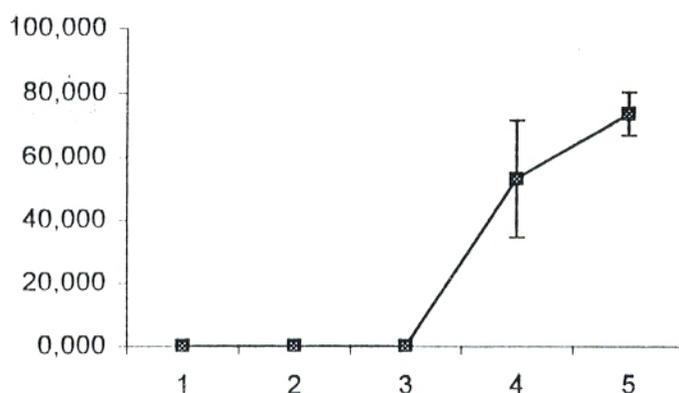


Figure 33 : Activité antibactérienne du produit F sur la croissance bactérienne de l'Entérocoque exprimée en Pourcentage d'inhibition

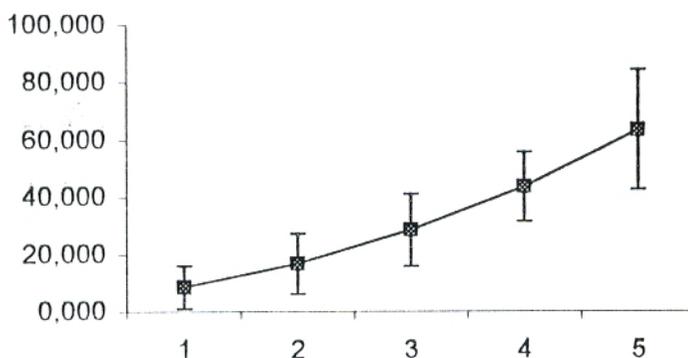


Figure 34 : Activité antibactérienne du produit T sur la croissance bactérienne de l'Entérocoque exprimée en Pourcentage d'inhibition

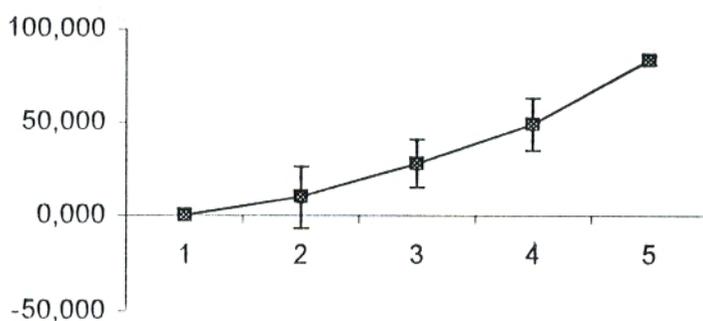


Figure 35 : Activité antibactérienne du produit BHC sur la croissance bactérienne de l'Entérocoque exprimée en Pourcentage d'inhibition

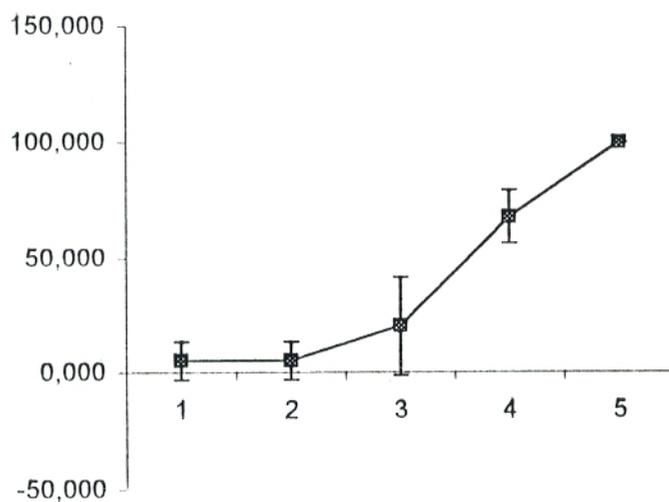


Figure 36 : Activité antibactérienne du produit BHF sur la croissance bactérienne de l'Entérocoque exprimée en Pourcentage d'inhibition

2- Détermination des CMI :

2.1- Souches à Gram positif :

Les résultats de la méthode de dilution relatifs à la souche de Staphylocoque sont satisfaisants, ceci s'explique par, des CMI plus ou moins basses qui sont de 70µg/ml pour le NF, entre 80-90 µg/ml pour le 1', de 90µg/ml pour le H, de 120µg/ml pour le A et enfin de 150 µg/ml pour le BHF.

Pour l'Entérocoque, les résultats du test de dilution sont encore plus encourageants, les CMI sont plus basses que celles enregistrées sur le Staphylocoque. Elles sont de 60µg/ml pour le H et le NF, de 110µg/ml pour le BHF et enfin de 150µg/ml pour le BHC.

Les résultats obtenus avec les souches d'Entérocoque et de Staphylocoque concordent parfaitement avec les propriétés de leur paroi Gram positive. De plus, les résultats de l'antibiogramme effectué sur les deux souches avec quelques antibiotiques usuels, montrent bien leur sensibilité à la plupart des antibiotiques utilisés et notamment les β-lactames.

Cependant, les CMI obtenues avec ces deux souches restent élevées si on les compare avec celles des antibiotiques usuels. En effet les CMI de la pénicilline G et de la pénicilline V sont de l'ordre de 2 µg/ml pour l'Entérocoque.

Pour les pénicillines anti-staphylococciques (médicilline, oxacilline, cloxacilline, ...) la CMI est d'environ 0,2µg/ml à l'exception des Staphylocoques méthicilline résistants, coagulase positif (*S. aureus*) ou coagulase négatif (*S. epidermidis*, *S. haemolyticus*).

Cette élévation des CMI par rapport aux CMI des antibiotiques usuels pourrait être due à la faible affinité des cibles : les P.L.P pour ces produits de synthèse. Cette affinité différente pour le P.L.P est déterminée par la nature des substituants du noyau β-lactame [BRIAND M.Y. 1986].

2.2- Souches à Gram négatif :

En examinant les résultats de la méthode de dilution relatifs à *E. coli*, on remarque que tous les produits testés affectent sa croissance normale mais

l'inhibition totale n'est pas obtenue même à la concentration maximale utilisée c'est à dire 150µg/ml.

L'effet antibactérien de nos monobactames ne devient effectivement intéressant qu'à haute concentration. Deux essais effectués sur cette souche à haute concentration (entre 90 et 180µg/ml) avec des monobactames disponibles confirment cette hypothèse.

Leurs résultats sont résumés dans les tableaux 5 et 6. Il ressort de ces tableaux que seul le produit A parmi les produits testés détermine une inhibition totale de cette souche à 180µg/ml, le produit NF, quant à lui, n'enregistre que 90% d'inhibition à la même concentration.

Pour les produits BHC et BHF, ils restent loin de leurs CMI même à 180µg/ml.

Concernant la souche de *P. aeruginosa*, les produits les plus actifs sur cette souche sont le NF, F, T, A et I'. Leurs CMI respectives sont de : 120µg/ml, entre 140-150µg/ml, au delà de 150µg/ml, 110µg/ml et 90µg/ml.

Les résultats obtenus par la méthode de dilution sur les deux souches Gram négatives ne sont pas surprenants ; ils s'expliquent si on suit le profil antibiotique des deux souches.

En effet, les résultats de l'antibiogramme effectué montrent bien la résistance des deux souches à la plupart des antibiotiques usuels testés.

De plus, à 0,5µg/ml c'est à dire à la CMI de l'aztréonam sur *E.coli* [NEUMAN M., 1990] notre souche d'*E.coli* n'est inhibée qu'à 70% lors des différents essais effectués, le même résultat est obtenu pour la souche de *P.aeruginosa* puisqu'à la concentration de l'aztréonam correspondant à la CMI : 12µg/ml [NEUMAN M., 1990] notre souche de *P.aeruginosa* n'est inhibée qu'à 90% environ.

Ce haut degré de résistance peut être dû pour une grande part à une altération de la perméabilité de la membrane externe. SPRATT B.G, 1983 confirme que chez les bactéries Gram négatives, la résistances intrinsèque est souvent due à une faible pénétration des antibiotiques à travers la membrane externe pour atteindre leurs cibles situées sur la membrane cytoplasmique.

Tableau 5 : Activité antibactérienne de quelques monobactames de synthèse sur la croissance bactérienne d'E. Coli (2^{ème} essai)

		Concentrations de monobactames en µg/ml				
		Témoin	90	120	150	180
Monobactames de synthèse	NF	0,09	0,05	0,04	0,03	ND
	A	0,09	0,05	0,05	0,04	ND
	BHC	0,09	0,07	0,07	0,06	ND
	BHF	0,09	ND	0,05	0,05	0,05

ND : valeur non déterminée

Tableau 6 : Activité antibactérienne de quelques monobactames de synthèse sur la croissance bactérienne d'E. Coli (3^{ème} essai)

		Concentrations de monobactames en µg/ml			
		Témoin	120	150	180
Monobactames de synthèse	NF	0,1	0,05	0,04	0,01
	A	0,1	0,05	0,03	0
	BHC	0,1	ND	0,06	0,05
	BHF	0,1	0,09	0,03	0,03

ND : valeur non déterminée

Cependant, l'altération de la perméabilité à travers la membrane externe ne peut pas être le seul facteur expliquant l'augmentation des CMI des souches Gram négatives en comparaison avec celles enregistrées sur les Gram positives surtout en présence de hautes concentrations d'antibiotiques comme c'est le cas.

ZIMMERMANN W., 1979 soutient que la résistance aux β -lactames ne peut pas être due à un seul facteur mais à l'action combinée de plusieurs facteurs. Il y a donc lieu de supposer que cette augmentation des CMI est due à l'action combinée de la faible perméabilité de la membrane externe à ces monobactames de synthèse et leur faible affinité pour leurs cibles.

3- Effet morphologique des monobactames de synthèse :

La liaison d'un antibiotique β -lactame avec sa cible conduit à son inactivation, cette dernière se manifeste par un changement morphologique. Cet effet morphologique dépend de l'affinité de l'antibiotique pour sa cible et de sa concentration [HAYES et WARD, 1986].

L'effet des β -lactames sur l'élongation, la forme ou la division cellulaire a été corrélé avec l'activité des P.L.P 1A/1B, 2 et 3 respectivement [SPRATT B.G., 1983].

L'interaction des monobactames de synthèse utilisés avec les quatre souches testées apparaît sous différents aspects suivant la cible influencée.

3.1- Sur le *P.aeruginosa* :

Les différents monobactames testés provoquent la formation de filaments cellulaires plus ou moins longs aux concentrations subinhibitrices. Les figures (31b, 31c) illustrent bien les formes filamenteuses observées en comparaison avec la forme normale du *Pseudomonas* cultivé sans produit de synthèse illustrée par la figure (31a).

L'aztréonam utilisé comme témoin provoque lui aussi la formation de filaments plus ou moins longs figure (31d)

La pénicilline, comme de nombreuses autres β -lactamines : céphalosporines et monobactames (particulièrement l'aztréonam) induisent la formation

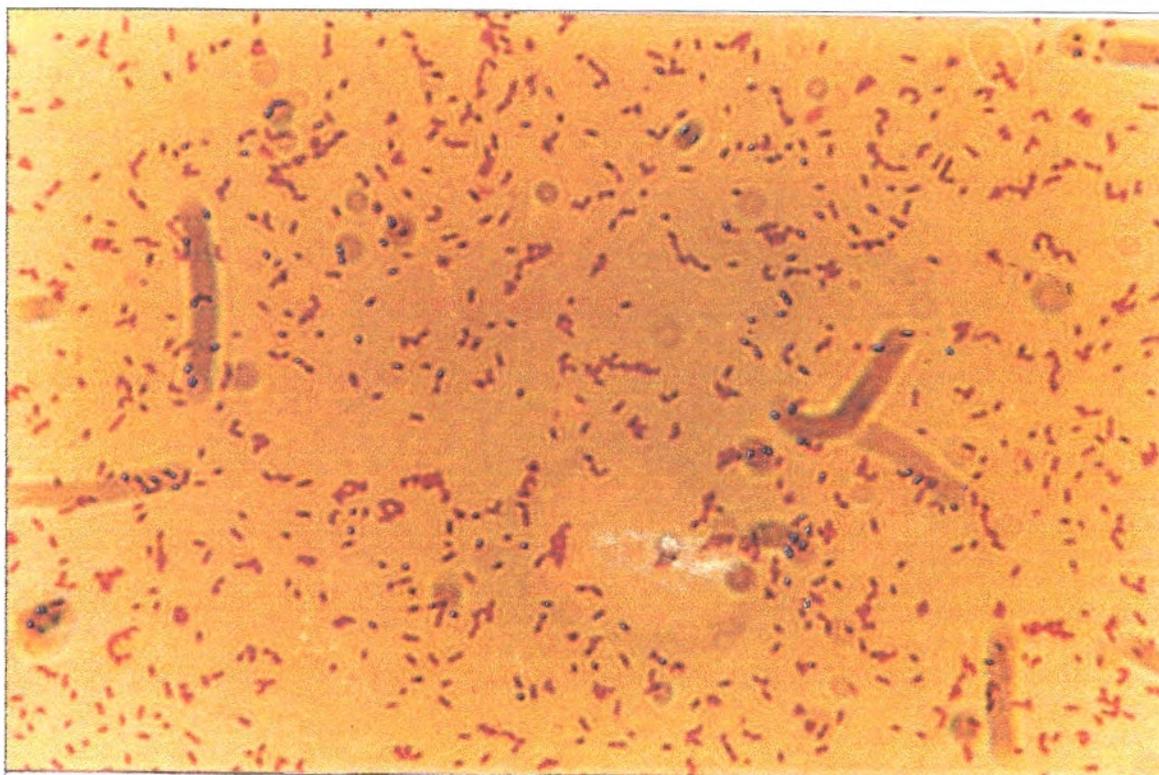


Figure 37a : La forme normale du Pseudomonas cultivé sans produit de synthèse

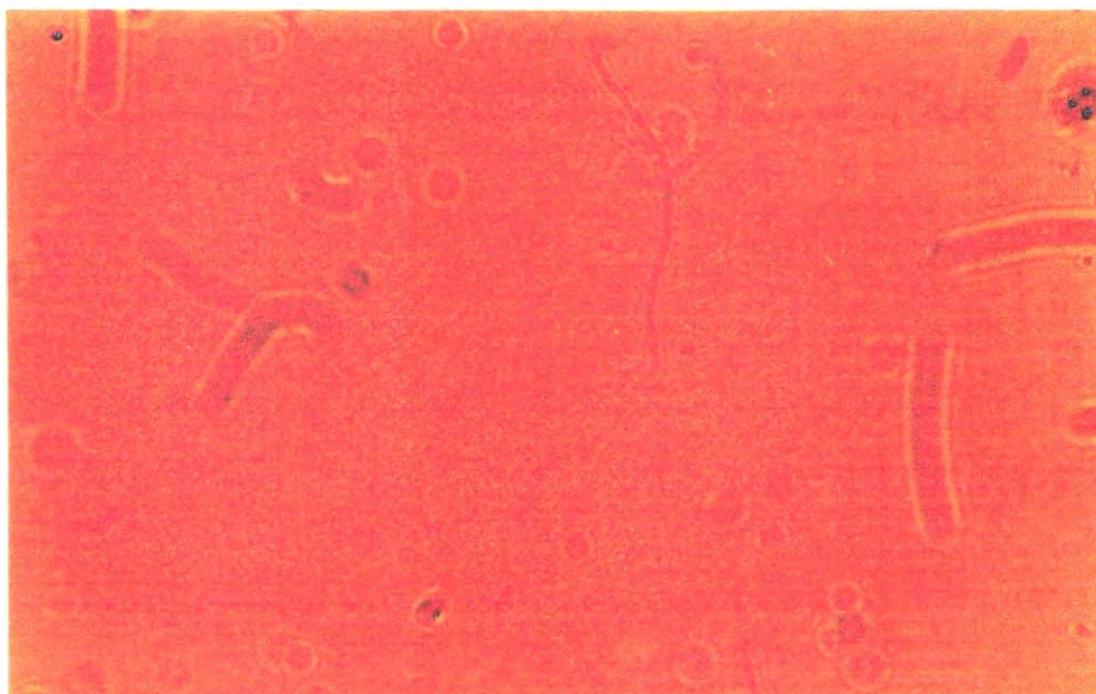


Figure 37b : L'effet morphologique du produit F sur la croissance du Pseudomonas



Figure 37c : L'effet morphologique du produit T sur la croissance du Pseudomonas

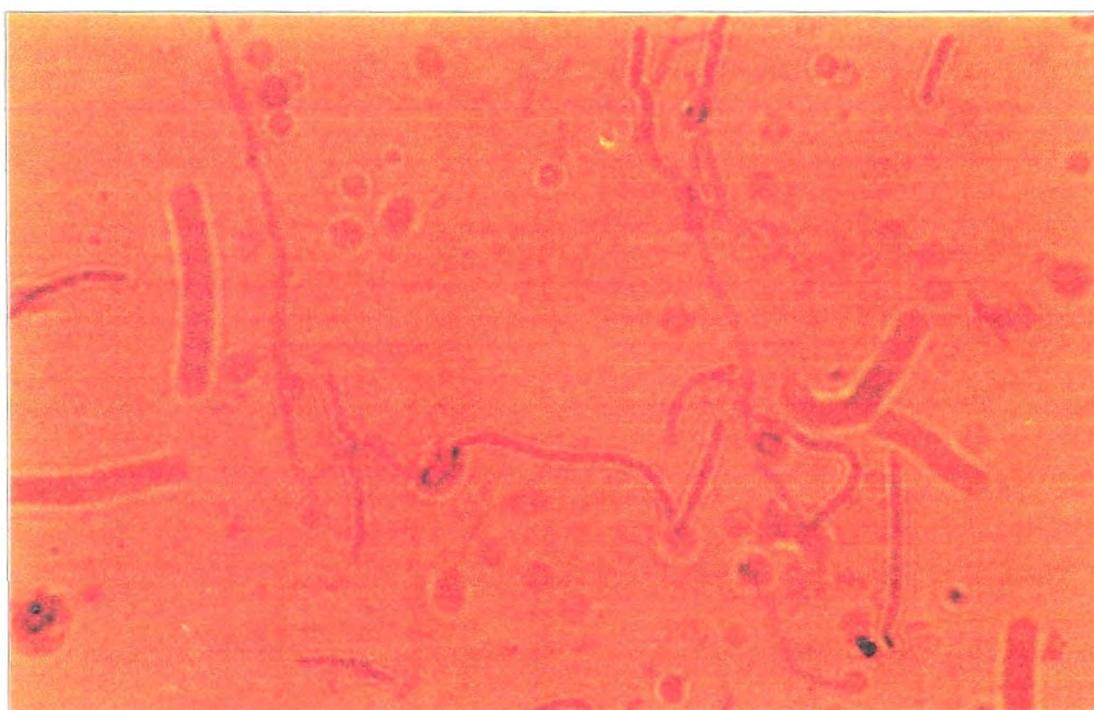


Figure 37d : L'effet morphologique de l'aztréonam sur la croissance du Pseudomonas

de filaments chez *E.coli* par inhibition de la formation du septum de division [HAYES et WARD, 1986].

En 1975, SPRATT a démontré que la P.L.P 3 était responsable de ce phénomène. En effet, il a été démontré qu'à partir d'un précurseur le N-acétyl-glucosamyl-N-acétyl-muramyl pentapeptide diphosphoryl undécaprénol, la P.L.P 3 permet la réticulation du peptidoglycane à travers deux réactions enzymatiques, une extension de la chaîne glycanique par une peptidoglycane transglycosylase et une transpeptidation par une peptidoglycane transpeptidase. Les deux réactions semblent être les propriétés de la P.L.P3 mais seule la réaction de transpeptidation est sensible à l'action des β -lactames [ISHINO et MATSUHACHI, 1981]

3.2- Sur *E.coli* :

L'effet morphologique des monobactames testés est différent de celui observé sur *P.aeruginosa*. La cible bactérienne des monobactames de synthèse semble être différente puisque ces derniers provoquent chez *E.coli* la formation de cellules ovulaires. Figure (32a). Cette forme cellulaire résulte de l'inactivation de la P.L.P2 chez *E.coli* [SPRATT, 1975 ; 1978].

Les β -lactames induisent généralement un effet morphologique similaire sur *E.coli* et *P.aeruginosa*, cependant les concentrations requises pour obtenir une réponse morphologique particulière chez *P.aeruginosa* et *E.coli* peuvent différer suite à des différences d'affinité pour les P.L.P, d'altération de la perméabilité ou d'inactivation par des β -lactamases.

Un exemple illustre cette différence ; il s'agit de la céf sulodine une α -sulphocéphalosporine qui induit la filamentation chez *P.aeruginosa* et le développement en sphéroplaste et lyse chez *E.coli*. Cette différence d'effet morphologique peut être expliquée en terme de différence d'affinité [HAYES et WARD, 1986]. Cette différence d'effet morphologique obtenue avec les mêmes produits montrent bien la diversité des propriétés des P.L.P et la sensibilité de chacune d'elles aux antibiotiques.

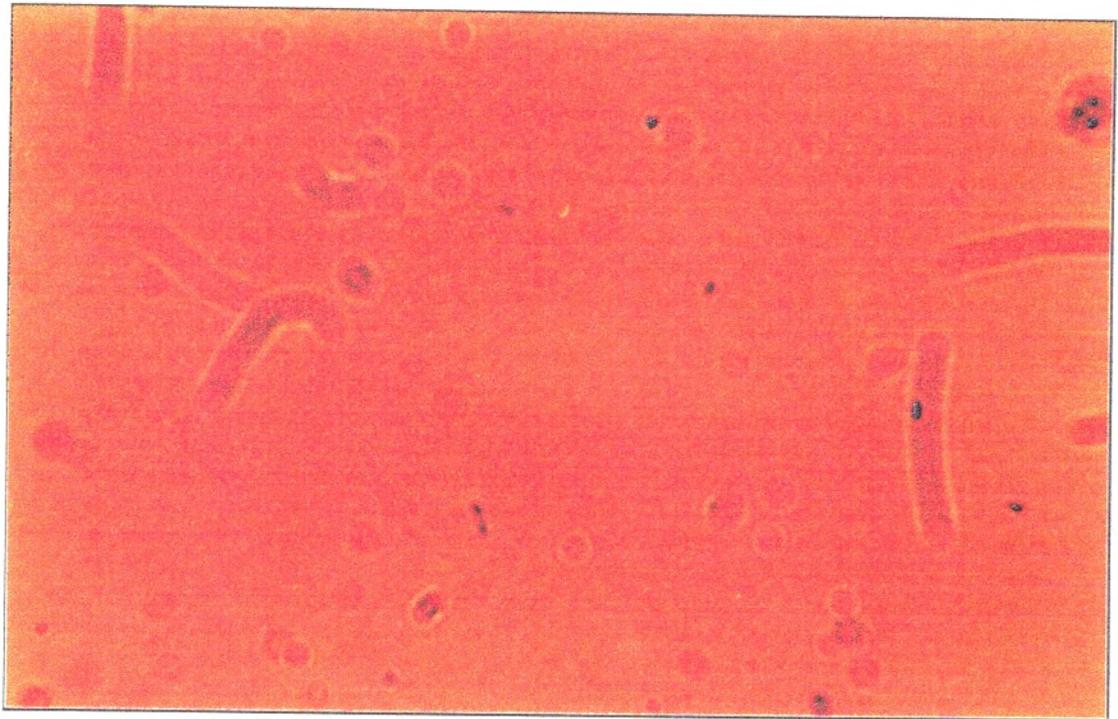


Figure 38a : L'effet morphologique du produit A sur la croissance d'E. coli

3.3- Sur les autres souches :

L'action des monobactames de synthèse provoque l'apparition de formes filamenteuses illustrées par les figures (33a et 33b).

Cependant, et contrairement aux bactéries à Gram négatif où un changement morphologique est corrélé à l'intervention d'une P.L.P particulière, chez les Gram positifs cette corrélation P.L.P/effet morphologique n'est pas possible [HAYES et WARD, 1986].



Figure 39a : L'effet morphologique du produit T sur la croissance du Staphylocoque



Figure 39b : L'effet morphologique du produit T sur la croissance de l'Entérocoque

4^{ÈME} PARTIE :

DISCUSSION GÉNÉRALE

Les antibiotiques β -lactames interfèrent avec le métabolisme de la paroi bactérienne. Leur faible toxicité et leur bonne tolérance par l'organisme les rend très largement utilisés en thérapie. L'émergence de nouveaux résistants motivent la recherche et le développement de nouveaux agents appartenant à cette grande famille d'agents antibactériens.

La synthèse chimique des monobactames a fait d'eux des agents particulièrement faciles à obtenir et a donc facilité l'étude de leurs relations structure-activité [BONNER et SYKES, 1984].

L'étude de leur relation structure-activité a permis de mettre au point plusieurs molécules très actives dont l'aztréonam qui doit son activité à la chaîne latérale aminothiozoly-méthoxy-imine caractéristique des céphalosporines. D'autres groupements ont été utilisés avec succès sur le cycle β -lactames en N-1, C-3 et C-4

Dans cette optique et à l'instar des différentes modifications qui ont été effectuées sur les monobactames récents, différents groupements ont été greffés sur le cycle β -lactame pour améliorer l'activité antibactérienne des produits de synthèse utilisés au cours de ce travail.

En considérant les différents groupements activateurs greffés en N-1 on voit que ceux-ci répartissent nos produits en trois groupes principaux :

Le groupe de produit ayant un groupement carbonyle (NF, F, A, H et T), celui des produits ayant une fonction amino (I') et enfin le groupe de produits ayant un azote substitué (BHA, BHC et BHF).

Selon la méthode de dilution, l'activité antibactérienne des produits de synthèse a été retrouvée pour presque tous les produits de synthèse, celle-ci est acceptable comme c'est le cas des produits NF, F, A, I', H et T, faible comme c'est le cas pour les produits BHA, BHC et BHF.

Ces résultats tendent à mettre en valeur les fonctions essentielles à l'action des β -lactames à savoir le cycle β -lactame qui est sans doute le siège de l'activité antibactérienne de ces molécules.

En examinant la structure moléculaire des produits qui ont inhibé la croissance bactérienne des souches testées et notamment les différents

groupements greffés sur le noyau β -lactame, on remarque que tous, à l'exception du produit 1', possèdent un groupement carbonyle activateur SLUSARCHYK et al., 1982 ; BREUER et al., 1982 in BONNER et SYKES, 1984 rapportent que l'utilisation d'un groupement carbonyle sur l'azote du noyau β -lactame conduit à une activité antibactérienne potentielle et une haute stabilité aux β - lactamases.

Cette activité antibactérienne requiert la greffe d'une chaîne aminothiazolyl-méthoxyimine en C-3 pour une activité maximale.

Les mêmes auteurs rapportent que l'activité de ces molécules sur les bactéries Gram positives est faible, ceci n'est pas le cas du produit NF qui se montre encore plus efficace sur les deux souches Gram positives que celles négatives. Cette particularité du produit NF va à l'encontre des propriétés non seulement des monobactames ayant un groupement carbonyle activateur mais aussi de ceux de l'aztréonam qui se caractérise par son action inhibitrice des espèces Gram négatives et qui est dépourvu d'activité vis à vis des Gram positifs [NEU et al., 1981] ; [RUSSEL et al., 1982].

Cette activité anti-Gram positive anti Gram-négative est retrouvée aussi chez le produit 1' dont l'activité antibactérienne sur *P. aeruginosa* et Staphylocoque est presque identique.

La particularité des antibactériens récents est leur spectre limité Gram négatif ou Gram positif comme c'est le cas de l'aztréonam. En effet l'amélioration de l'activité anti-Gram négative tend à diminuer ou à altérer l'activité anti-Gram positive.

De plus, la connaissance encore fragmentaire de la structure de la paroi, variable suivant la nature de la bactérie et qui détermine pour une part la sensibilité de la bactérie aux β -lactames, ne permet pas de prévoir les modifications de chaînes latérales qui seront efficaces [BRIAND M.Y., 1986]

Le produit 1' possède une autre particularité qui le rend particulièrement intéressant et qui est représenté par la substitution en N-1. En effet, ce produit possède un groupement amino en N-1. Celui-ci, qui à notre connaissance n'a pas été utilisé auparavant comme groupement

activateur, se montre très efficace. On est peut être en présence d'un nouveau groupement activateur du noyau β -lactame.

Concernant les produits H et T possédant tous deux le même groupement activateur, on remarque que le produit H est actif sur les bactéries Gram positives par contre le produit T l'est sur les souches Gram négatives. Leur différence d'activité doit résider dans leur substitution en C-3 et C-4, la polarité du produit favorisée par les groupements greffés en C-3 et C-4 doit être à l'origine de son activité sur les souches Gram positives probablement en facilitant sa pénétration à travers la paroi Gram négative facilitant ainsi son accès à sa cible ce qui n'est pas le cas du produit H dont le caractère non-polaire doit entraver la pénétration à travers la paroi Gram négative et donc diminuer l'activité, par contre ce caractère non polaire doit améliorer l'activité vis-à-vis des Gram positifs. Cette observation concorde avec celle de BRIAND M.Y., 1986 qui rapporte qu'une augmentation de sensibilité pour les bactéries à Gram négatif s'accompagne le plus souvent d'une diminution d'activité sur les bactéries à Gram positif.

La présente étude montre bien l'efficacité des groupements carbonyle et amino en N-1, cette efficacité est d'autant plus importante qu'elle s'accompagne d'un groupement furyle ou nitrofuryle en C-4. L'action de ces produits pourra être améliorée par d'autres substitutions efficaces en C-3 et notamment la chaîne aminothiazolyl-méthoxyimine qui d'après BONNER et SKYES, 1984 semble être nécessaire pour avoir une activité maximale des produits ayant un groupement carbonyle activateur.

L'activité antibactérienne de nos produits ne peut être négligé. Cependant, on remarque que les CMI restent très élevées si on les compare avec les CMI des β -lactames usuels ou de l'aztréonam.

L'amélioration de l'activité antibactérienne et par conséquent la diminution des CMI peuvent résulter d'une meilleure pénétration, d'une meilleure fixation sur la cible intrabactérienne, d'une plus grande stabilité aux β -lactamases. La première proposition étant la principale propriété des β -lactames les plus récents.

La meilleure pénétration peut être obtenue par des substitutions en C-3 et C-4 de groupements appropriés. Le produit T élucide bien cette notion. Sa grande polarité favorisée par les substitutions en C-3 et C-4 doit le rendre plus accessible à sa cible que le produit H par exemple dont les substitutions non-polaires en C-3 et C-4 doivent sûrement altéré sa pénétration à travers la membrane externe des Gram négatifs.

Ceci d'un côté, d'un autre côté, les groupements furyle et nitrofuryle semblent donner de bons résultats aussi bien sur les Gram positifs que sur les Gram négatifs probablement par amélioration de l'accessibilité des produits à leurs cibles intrabactériennes. Cependant, les résultats obtenus restent loin de ceux enregistrés par exemple pour l'aztréonam sur les bacilles à Gram négatif. En effet, NEU et LABTHAVIKUL, 1981 rapportent par exemple qu'une concentration d'aztréonam $\leq 0,4 \mu\text{g/ml}$ inhibe 90% d'E.Coli, Klebsielle Salmonella, Providencia, Shigella, Citrobacter et Morganella.

Des travaux réalisés sur l'aztréonam prouve que celui-ci pénètre facilement la membrane externe du *P. aeruginosa* et *E. Coli* et probablement de la plupart des souches Gram négatives aussi [RUSSEL et FURR, 1982]. Cette grande capacité de l'aztréonam à pénétrer la membrane externe des bactéries, en plus de son affinité pour la P.L.P3 : PLP essentielle dans la morphogénèse de la paroi, et enfin sa résistance à l'hydrolyse par les β -lactames font de lui un antibiotique très efficace sur la plupart des bacilles à Gram négatif.

Comme pour l'aztréonam, les monobactames de synthèse provoquent, aux concentrations subinhibitrices, la croissance du *Pseudomonas* sous forme de longs filaments. Ceci semble indiquer que ces produits affectent la P.L.P3 enzyme responsable de la septation au cours de la division cellulaire.

Sur *E. Coli*, nos produits de synthèse provoquent la formation de cellules ovulaires. BRION I.D, 1992 rapporte que les pénicilline et céphalosporine induisent généralement un effet morphologique similaire sur *E. Coli* et *P. aeruginosa* seulement les concentrations requises pour obtenir une réponse morphologique particulière chez *P. aeruginosa* et *E. Coli* peuvent

différer résultat des différences d'affinité pour les P.L.P, de perméabilité et d'action des β -lactamases.

Comme pour les souches à gram négatif, l'interaction de nos produits avec les souches Gram positives provoquent leur croissance en filaments, cependant les études qui ont décrit les effets morphologiques du traitement de ces micro-organismes par des concentrations subinhibitrices de β -lactames ne rapportent pas leur interaction avec les P.L.P [BRIAND J.D., 1992]

CONCLUSION

Au terme de cette étude, on peut dire que cette première évaluation du pouvoir antibactérien des monobactames de synthèses testés nous paraît fructueux mais n'en demeure pas moins insuffisante et que d'autres études s'avèrent nécessaires pour prendre la relève et faire ce que l'on n'a pas pu faire durant ce travail, et notamment :

- L'amélioration de l'activité antibactérienne de ces produits par d'autres substitutions en C-3 et C-4 de façon à obtenir des CMI moins importantes.
- Tester ces produits de synthèse sur un nombre plus importants de souches bactériennes, cela suppose un approvisionnement continu et en quantités suffisantes de produits de synthèse ce qui n'a pas été le cas durant la présente étude et le manque d'approvisionnement en produits de synthèse nous a contraint à se limiter à l'évaluation de leur pouvoir antibactérien sur quatre souches seulement.
- Il faut envisager aussi l'étude de l'effet synergique de ces monobactames avec des β -lactames usuels et/ou avec des aminoglycosides.

Et enfin une étude au niveau moléculaire s'impose pour étudier l'accessibilité des produits à leurs cibles, leurs degré d'affinité aux différentes PLP ainsi que leur stabilité aux β -lactamases. Cette étude est nécessaire pour caractériser ces produits qui nous l'espérons tous trouveront un jour le chemin de leur utilisation en clinique.

RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

ANONYME

Détermination de la sensibilité des germes aux agents antibactériens.

Bactériologie / AntibioGramme.

Biomérieux Ed. 1986 p. 119-122

ARNOULD J.C, BOUTRON P and PASQUET M.J. (1992)

Synthesis and Antibacterial activity of C4 substituted monobactams.

Eur. J. Med Chem. N°27 p. 131-140

BARRY A.L, THORNSBERRY C., JONES R.N and GAVAN T.L. (1985)

Aztreonam : antibacterial activity, β - lactamase stability and interpretive standards and quality control guidelines for disk - diffusion susceptibility tests.

Reviews of infectious diseases Vol. 7 supplement 4

BAUMGARTNER J.D (1992)

Pharmacologie Vol.2

Ed. O.P.U.

BELABDELLI F. (1996)

Amino-acides et hydrazones synthons des β -lactames.

Thèse de Magister, université ABOUBEKR BELKAÏD Tlemcen.

BERCHE P. (1997)

Les antibiotiques demain.

Revue Médecine thérapeutique hors série n°1 p. 4-6

BONNER D.P. and SYKES R.B (1984)

Structure – activity relationships among the monobactams

J. Antimicrob chemother. Vol. 14 p. 313 – 327

**BREUER H., CIMARUSTI C.M., DENZEL T.H., KOSTER W.H,
SLUSARCHYK W.A. and TREUNER U.D. (1981)**

Monobactams : structure activity relationships leading to SQ 26,
776

J. of antimicrob. Chemother. Vol 8 suppl. E p 21 – 28

BRIAND M.Y. (1986)

Mécanismes moléculaires de l'action des antibiotiques

Edition Masson p. 370

BRION J.D. (1992)

Médicaments antibiotiques.

Ed. Médicales internationales p. 22-35, p. 207-233

BRYSKIER A. (1997)

Historique, classification et perspectives de développement des
antibiotiques et des agents antibactériens.

Revue Médecine thérapeutique hors série n°1 p. 7-18.

BUESING M.A and JORGENSEN J.H. (1984)

In vitro activity of Aztreonam in combination with newer β -
lactams and Amikacin against multiply resistant Gram – negative
bacilli.

Antimicrob Agents and chemother. Vol 25 n°2 p. 283 – 285

BUSH K., FREUDENBERGER J.S., and SYKES R.B. (1982)

Interaction of Aztreonam and Related monobactams with β - lactamases from Gram negative bacteria.

Antimicrob Agents and Chemother. Vol. 22 n°3 p. 414 – 420

CHABERT Y.A. (1982)

Sensibilité bactérienne aux antibiotiques.

In « Bactériologie médicale » Leminor L. et Véron M.

Ed. Flammarion Médecine-Sciences p. 204-212.

CHANTOT J.F., KLICH M., TEUTSCH G, BRYSKIER A., COLLETTE P., MARKUS A., and SEIBERT G. (1992)

Antibacterial activity of RU44 790, a new N – tetrazolyl monocyclique β - lactam.

Antimicrob agents and Chemother. Vol. 36, N°8 P. 1756 – 1763.

CURTIS N.A.C., ORR D., ROS G.W, and BOULTON M.G. (1979)

Competition of β - lactam antibiotics for the penicillin – binding proteins of *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella aerogenes*, *Proteins rettgeri* and *Escherichia coli* :

Comparison with antibacterial activity and effects upon bacterial morphology.

Antimicrob Agents and Chemother. Vol. 16 n°3 p. 325 – 328

CURTIS N.A.C., ORR D., ROSS G.W. and BOULTON M.G. (1979)

Affinities of penicillins and cephalosporins for the penicillin – binding proteins of *Escherichia Coli* K12 and their antibacterial activity.

Antimicrob Agents and Chemother. Vol. 16 n°5 p. 533 – 539

CURTIS N.A.C., BROWN C., BOXALL M. and BOULTON M.G. (1979)

Inhibition of *Escherichia coli* K12 by β - lactam antibiotics with poor antibacterial activity : interaction of permeability and intrinsic activity against penicillin – binding proteins.

Antimicrob Agents and Chemother. Vol. 15 n°3 p. 332 – 336

FAUCHERE J.L. (1990)

Bactério – fiches

Edition Ellipses p. 33-49

GODFREY A. J., BRYAN L.E., and RABIN H.R. (1981)

β - lactam – resistant *Pseudomonas aeruginosa* with modified penicillin – binding proteins emerging during cystic fibrosis treatment.

Antimicrobial Agents and chemotherapy. Vol 19 n°5 p. 705 – 711

GRAYSON M.L and ELIOPOULOS G.M. (1990)

Antimicrobial resistance in the intensive care unite

Seminars in Respiratory infections vol. 5 n°3 p. 204 – 214

GEORGOPAPADAKOU N.H., SMITH S.A., and SYKES R.B. (1982)

Mode of action of Aztreonam

Antimicrob Agents and Chemother. Vol. 21 n°6 p. 950 – 956

GEORGOPAPADAKOU N.H., and LIU F.Y. (1980)

Penicillin – binding proteins in bacteria

Antimicrob Agents and Chemother. Vol. 18 n°1 p. 148 – 157

HAYES M.V and WARD J.B (1986)

The role of Penicillin binding proteins in the antibacterial activity of β - lactam antibiotics.

In antibiotics in Laboratory medicine edited by V. LORIAN, WILLIAMS and WILKINS p. 722 – 756

ILDA K., HIRATA S., NAKAMUTA S., and KOIKE M. (1978)

Inhibition of all division of Escherichia coli by a new synthetic penicillin Piperacillin.

Antimicrob. Agents and Chemother., Vol. 14 n°2 p. 257 – 266

ISHINO F. and MATSUHASHI M., (1981)

Peptidoglycan synthetic enzyme activities of highly purified penicillin – binding protein 3 in Escherichia coli : A septum – forming reaction sequence.

Biochem. And Biophys. Research communications vol. 101 n°3 p. 905 – 911

JACOBUS N.V., FERREIRA M.C, and BARZA M. (1982)

In vitro activity of Aztreonam, a monobactam antibiotic

Antimicrob Agents and Chemother. Vol. 22 n°5 p. 832 – 838

JARLIER V. (1997)

Mécanismes de résistance aux antibiotiques

Revue Médecine-thérapeutique hors série n°1 p. 46-60

LECLERC H., GAILLARD J.L. and SIMONET M. 1995

Microbiologie générale : la bactérie et le monde bactérien

Edition doin Paris.

MARKUS A., and SEIBERT G. (1992)

Antibacterial activity of RU 44 790, a new N. tetrazolyl monocyclique β - lactam

Antimicrob Agents and Chemother. Vol. 36 n° 8 p. 1756 – 1763

**NAJIOULLAH F., FRENEY J., PELLON G., MEUGNIER H.,
DORLEAC E., DURAND C., FLEURETTE J. (1989)**

Modifications du peptidoglycane de la souche de *Staphylococcus aureus* P18 après utilisation de six antibiotiques actifs sur la paroi bactérienne.

Path. Biol, 37 n°5 p. 370-374.

BRION J.D. (1992)

Médicaments antibiotiques.

Ed. Médicales internationales p. 22-35, p. 207-233

**NAJIOULLAH F., PELLON G., FRENEY G., MICHEL G. et
FLEURETTE J. (1993)**

Cell-wall active antibiotics induce specific alterations of the electrophoretic profile of membrane proteins in a *Staphylococcus aureus* strain.

Microbios letters 76 p. 19-28.

NEUMAN M. (1990)

VADE-MECUM des antibiotiques et agents chimiothérapeutiques anti-infectieux.

Ed. Maloine

NEU H.C (1983)

Structure – activity relations of new β - lactam compounds and in vitro activity against common bacteria.

Rev. Of Inf Diseases Vol. 5 supplement 2 p. 319 – 337

NEU H.C. and LABTHAVIKUL P. (1981)

Antibacterial activity of a monocyclique β - lactam

SQ 26 , 776

J. Antimicrob Chemother. Vol. 8 suppl. E. p. 111 – 122

PHILIPPIN A., ARLET G., ROUVEAU M. (1991)

β -lactamases in les inhibiteurs de β -lactames.

Journée de pharmacologie clinique

UER Xavier Bichat Paris, p. 9-31.

PRESCOTT, HARLEY – KLEIN (1993)

Microbiologie

De Boeck Université.

PELLON G. et NAJIOULLAH F. (1992)

La résistance intrinsèque des Staphylocoques aux β - lactamines :
paroi cellulaire et protéines de liaison à la pénicilline.

Bull. Inst. Pasteur Vol. 90 p. 175 – 192

RUSSEL A.D. and FURR J.R. (1982)

Penetration of SQ 26, 776, a new monobactam antibiotic, into
Escherichia Coli and Pseudomonas aéruginosa

J. Antimicrob Chemother. Vol. 9 p. 329 – 331

SHAH P.M., LOSERT – BRUGGNER B. and STILLE W. (1981)

Bactericidal activity of SQ 26,776

J. antimicrob. Agents and Chemother. Vol 8 suppl. E. p. 77-80

SPRATT B .G. (1983)

Penicillin – binding proteins and the future of β - lactam antibiotics

J. of General microbiology Vol. 129 p. 1247 – 1260

SPRATT B.G. , (1977)

Properties of the penicillin – binding proteins of Escherichia coli K12

Eur. J. Biochem Vol. 72 p. 341 – 352

SOUGAKOFF W. (1991)

Mode d'action des inhibiteurs de β -lactamases in les inhibiteurs de β -lactamases.

Journée de pharmacologie clinique

UER Xavier Bichat Paris, p. 33-40.

SYKES R.B. , KOSTER W.H. and BONNER D.P. (1988)

The new monobactams : chemistry and biology.

J. Clin. Pharmacol. Vol. 28 p. 113 – 119

SCHORDERET M. et Coll. (1992)

Pharmacologie des concepts fondamentaux aux applications thérapeuthiques. Volume 2

Edition O.P.U

**SYKES R.B., BONNER K., BUSH N.H., GERGOPAPADAKOU N.H.,
and WELLS J.S. (1981)**

Monobactams : monocyclic β - lactam antibiotics produced by
bacteria.

J. Antimicrob Chemother. Vol. 8 suppl. E. p. 1-16

SYKES R.B and BONNER D. (1985)

Modern β - lactam antibiotics

Pharmac. Ther. Vol. 29 p. 321-352

SUZUKI H., et al., (1980)

In vitro peptidoglycan polymerisation catalysed by penicillin
binding protein 1b of Escherichia coli K12

FEBS Letters Vol. 110 n° 2 p.245-249

TANKOVIC J. et DUVAL J. (1997)

Mécanismes d'action des antibiotiques

Revue Médecine thérapeutique hors série n°1 p. 37-45

TOMASZ A., (1980)

On the mechanism of the irreversible antimicrobial effects of β -
lactams.

Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 289 p 303-309

VANDNESCH F. et ETIENNE J. (1997)

Protéines liant de la pénicilline : cibles des β -lactamines.

Revue Médecine thérapeutique hors série n°1 p. 61-65.

WAXMAN D.J. and STROMINGER J.L. (1983)

Penicillin – binding proteins and the mechanism of action of β - lactam antibiotics :

Ann. Rev. Biochem.

WITCHITZ J.L. (1982)

Classification et mécanismes d'action des antibactériens in
Bactériologie médicale Leminor L. et Véron M.

Ed. Flammarion Médecine-sciences p. 192-203.

**YOSHIDA C., TANAKA K., NAKAND J. TODŌ Y., YAMAFUJİ T.,
HATTORI R., FUKUOKA Y. and SAIKAWA I (1986)**

Studies on monocyclic β - lactam antibiotics : synthesis and
antibacterial activity of N - (aromatic heterocyclic substituted)
azetidín - 2 - ones.

J. of antib. Vol. 39 n°1 p. 76 -89

ZIMMERMANN W. (1979)

Penetration through the gram - negative all wall : a co -
determinant of the efficacy of beta - lactam antibiotics

Internat. J. of Clin. Pharmacol. And biopharm. Vol. 17 n° 3 p.131-
134

ZIMMERMANN W., (1980)

Penetration of β - lactam antibiotics into their target enzymes in
Pseudomonas aeruginosa : comparison of a highly sensitive
mutant with its parent strain.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy vol. 18 n°1 p. 94 - 100

ZIMMERMANN W. et ROSSELET A., (1977)

Function of the outer membrane of *Escherichia Coli* as a permeability barrier to β - lactam antibiotics.

Antimicrob Agents and Chemother. Vol. 12 n° 3 p. 368– 372