

## TABLE DES MATIERES

<b>INTRODUCTION</b> .....	1
<b>BETA-LACTAMINES &amp; BETA-LACTAMASES</b> .....	8
I- STRUCTURE DES BETA-LACTAMINES:.....	9
II- STRUCTURE DE LA PAROI BACTERIENNE:.....	15
III- MODE ET SITE D'ACTION DES BETA-LACTAMINES:.....	18
IV- RESISTANCE AUX BETA-LACTAMINES:.....	23
a- Généralités:.....	23
b- Imperméabilité de la paroi:.....	24
c- Modifications de la cible cellulaire de l'antibiotique:.....	26
d- Inactivation enzymatique par production de bêta-lactamases:.....	27
V- PROPRIETES DES BETA-LACTAMASES:.....	29
VI- CLASSIFICATION DES BETA-LACTAMASES:.....	32
<b>ETUDE BACTERIOLOGIQUE DE LA RESISTANCE AUX BETA-LACTAMINES:</b> .....	48
A- MODE OPERATOIRE:.....	48
1- Souches bactériennes:.....	48
2- Etude des biotypes:.....	49
3- Antibiogramme par diffusion: méthode des disques.....	49
4- Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) par technique de dilution en milieu gélosé:.....	52
5- Transfert des gènes de résistance:.....	54
B- RESULTATS:.....	56
1- Biotypic:.....	56
2- Antibiogramme:.....	57
3- Transfert:.....	60
4- Sensibilité des souches aux antibiotiques:.....	62
5- Index de synergie:.....	66
<b>PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES ET CINETIQUES DES BETA-LACTAMASES:</b> .....	71
A- MATERIEL ET METHODES:.....	71
a- Culture bactérienne:.....	71
b- Extraction des bêta-lactamases:.....	72
c- Activité enzymatique:.....	72
c-1 Technique de l'enzymogramme:.....	72
c-2 Dosage micro-acidimétrique:.....	73
d- Purification de la bêta-lactamase:.....	75
d-1 Déroulement de la purification:.....	75
d-1-1 Précipitation au sulfate d'ammonium:.....	76
d-1-2 Gel filtration:.....	77
d-1-3 Adsorption sur échangeurs d'ions	

d-1-4	Electrophorèse de zone:	79
d-1-5	Electro-élution:	81
e-	Isoélectrofocalisation:	82
f-	Electrophorèse verticale SDS-polyacrylamide:	84
g-	Electrophorèse en gradient de pH:	89
h-	Détermination de la constante d'affinité Km:	91
i-	Effet des inhibiteurs:	92
<b>B -</b>	<b>RESULTATS:</b>	<b>93</b>
a-	Extraction brute des bêta-lactamases:	93
b-	Purification de la bêta-lactamase:	95
b-1	Précipitation au sulfate d'ammonium:	95
b-2	Gel filtration:	95
b-3	Adsorption sur échangeurs d'ions:	97
b-4	Electrophorèse de zone - Electroélution:	97
c-	Isoélectrofocalisation:	97
d-	Détermination de la masse moléculaire:	99
e-	Electrophorèse en gradient de pH:	102
f-	Détermination des constantes d'affinité Km:	102
g-	Effet des inhibiteurs:	103
<b>C -</b>	<b>DISCUSSION:</b>	<b>106</b>
<b>ETUDE GENETIQUE DES BETA-LACTAMASES:</b>		<b>111</b>
<b>A -</b>	<b>PROTOCOLE EXPERIMENTAL:</b>	<b>112</b>
I-	Minipréparation de l'ADN plasmidique:	112
II-	Electrophorèse en gel d'agarose:	114
III-	Détermination de la taille réelle des plasmides pUD100 et pUD101:	115
IV-	Amplification enzymatique in vitro de l'ADN:	118
V-	Préparation de la sonde de marquage:	124
V-1	Choix et digestion du plasmide:	124
V-2	Electrophorèse en gel d'agarose Nuesieve à 3%:	124
V-3	Purification de la sonde:	126
V-4	Marquage de la sonde par la technique "Random primers" (Maniatis T. et coll, 1982):	127
VI-	Technique du slot blot:	128
VI-1	Dépôt des échantillons sur membrane de nylon:	128
VI-2	Préhybridation de la membrane:	129
VI-3	Hybridation de la membrane:	129
VI-4	Lavage de la membrane:	129
VI-5	Exposition de la membrane (autoradiographie):	131
VII-	Détection de la mutation ponctuelle:	131
VII-1	Mutation créant ou abolissant un site de restriction:	132
VIII-	Séquençage direct du produit de PCR:	133
VIII-1	Protocole:	134

VIII-1	Protocole:.....	134
VIII-1-1	Purification des produits de PCR:.....	134
VIII-1-2	Dénaturation de l'ADN amplifié:.....	135
VIII-1-3	Hybridation amorce-matrice:.....	135
VIII-1-4	Réaction de marquage:.....	135
VIII-1-5	Gels de séquençage (polyacrylamide à 8%, urée 8 M):.....	136
VIII-1-6	Séchage du gel et exposition:.....	137
IX-	Digestion de l'ADN amplifié:.....	137
ANNEXE	.....	139
B -	RESULTATS:.....	142
I-	Le plasmide et sa taille:.....	142
I-1	Contrôle de l'ADN extrait:.....	142
II-	Amplification et hybridation spécifiques:.....	146
III-	Détection de la mutation ponctuelle:.....	150
IV-	Séquençage direct des produits de PCR:.....	152
V-	Création d'un nouveau site de restriction:.....	155
C -	DISCUSSION.....	157
C-1	Comparaison des séquences nucléotidiques:.....	157
C-2	Valeur de l'acide aminé 241:.....	161
C-3	Structure tridimensionnelle des bêta-lactamases à site sérine actif:.....	163
C-4	Position du résidu 241 dans la structure tridimensionnelle:.....	166
C-5	Implication de la substitution 241 dans la résistance à l'acide clavulanique:.....	167
<b>CONCLUSION GENERALE:</b>	.....	<b>179</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE:</b>	.....	<b>184</b>