



Type of the Paper (Article)

## Effet de quelques flavonoïdes sur une pénicillinase de *Bacillus cereus*

Boussoualim N. \*, Kebabi M., Benmila A., Krache I., Arrar L. and Baghiani A.

Laboratory of Applied Biochemistry, Department of Biology, Faculty of Sciences, University Ferhat Abbas of Setif 1, 19000, Algeria.

\*Author to whom correspondence should be addressed, Email: [naouel\\_24@yahoo.fr](mailto:naouel_24@yahoo.fr)

Received: 13/03/2017

Accepted: 25/12/2017

DOI: <https://doi.org/10.5281/zenodo.1130838>

**Résumé:** L'effet inhibiteur de certains flavonoïdes sur l'activité d'une  $\beta$ -lactamase d'une souche de *Bacillus cereus* a été testé et la relation structure-fonction a été établie. L'activité de La  $\beta$ -lactamase est déterminée en présence de différentes concentrations de la pénicilline G; le  $K_m$  est de  $106,3256 \pm 32,0861 \mu M$  et la  $V_{max}$  est de  $0,6836 \pm 0.00974 \mu M/min$ . Ces résultats reflètent une affinité de l'enzyme sur la pénicilline G. Six molécules de flavonoïdes ont été testées pour leur capacité à inhiber la  $\beta$ -lactamase. Le type d'inhibition et les constantes d'inhibition ( $K_i$ ) ont été déterminés à une concentration de  $150 \mu M$ . Parmi les molécules testées, l'épicatéchine et la naringine sont des inhibiteurs incompétitifs. La catéchine, la morine et la rutine sont des inhibiteurs compétitifs. La naringénine ne présente aucun effet inhibiteur. Les flavonoïdes ont une fonction 4-oxo semblable à celle de l'acide clavulanique et la pénicilline G. Il semble que le type du cycle, la position de OH et la présence d'un sucre dans les structures des molécules ont une importance majeure.

**Mots clés :** Inhibiteurs,  $\beta$ -lactamase, flavonoïdes, *Bacillus cereus*.

### I. Introduction

Les antibiotiques ont été longtemps considérés comme des armes efficaces pouvant éradiquer toute maladie infectieuse d'origine bactérienne. Toutefois, l'utilisation abusive de ces composés dans le domaine médical a eu pour conséquence l'apparition progressive d'une multitude de résistances chez les microorganismes. Les  $\beta$ -lactamines sont les antibiotiques les plus utilisés en clinique. La résistance bactérienne aux  $\beta$ -lactamines est due principalement à la production d'enzymes ( $\beta$ -lactamases) capables d'hydrolyser l'anneau  $\beta$ -lactame commun à tous les molécules de cette classe d'antibiotiques. (Finberg et Guharoy, 2012 ; Page, 2012). En plus, le traitement annuel des infections causées par les bactéries résistantes devient de plus en plus coûteux. Afin de faire face à ce problème de coût, les populations démunies se sont retournées vers la médecine traditionnelle.

Ce travail s'inscrit donc dans cette problématique générale qui consiste à chercher d'autres molécules qui peuvent remplacer les inhibiteurs suicides (clavulanate, tazobactam et sulbactam). Nous nous sommes intéressés plus particulièrement à l'effet des flavonoïdes sur une  $\beta$ -lactamase purifiée à partir d'une souche de *Bacillus cereus*. Nous avons fixé comme objectif les points suivants :

- Détermination des paramètres cinétiques du  $\beta$ -lactamase d'une souche de *Bacillus cereus*.
- Etude de l'effet inhibiteur de quelques flavonoïdes et la détermination de leurs types d'inhibition.
- Etude de la relation structure-fonction.

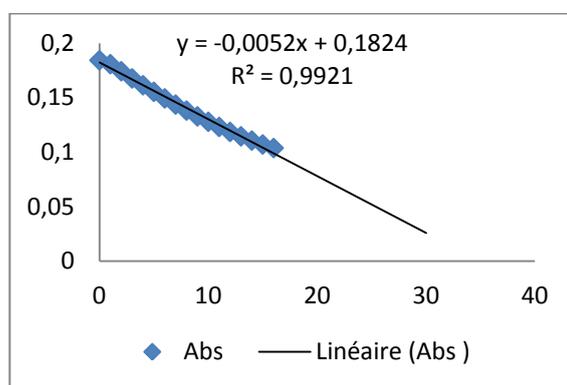
## II. Experimental Section

Les produits chimiques utilisés sont une pénicillinase purifiée à partir de *Bacillus cereus* qui est capable d'hydrolyser l'anneau  $\beta$ -lactame commun à cette classe d'antibiotiques (pénicillines, céphalosporines, monobactams, carbapénèmes) provient de Sigma-Aldrich sous forme d'une poudre lyophilisée. Cette enzyme est conservée à 2-8 °C.

- L'antibiotique utilisée est la pénicilline G
- Les flavonoïdes utilisés sont : épicatechine, catéchine naringénine, naringine, morine, rutine,

### II.1. Le dosage de l'activité enzymatique

L'activité enzymatique est mesurée en présence d'une solution de 200  $\mu$ M de pénicilline G dans le tampon phosphate 0,1 M, pH 7,1. L'enzyme est ajoutée à un volume réactionnel final de 500  $\mu$ l et la diminution de l'absorbance est suivie à 235 nm dans un spectrophotomètre UV-Vis 8500 (Figure 1) pendant 30 secondes. La vitesse initiale d'hydrolyse en  $\mu$ mol/min/mg est calculée à partir du coefficient d'extinction moléculaire ( $\epsilon_{235\text{nm}}=560 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). Une unité enzymatique est définie comme la quantité de protéine nécessaire pour hydrolyser un  $\mu$ mole de pénicilline G par min à 25°C dans 500  $\mu$ l de tampon phosphate 0,1 M, pH 7,1. Les mêmes conditions sont utilisées pour la détermination de tous les paramètres cinétiques (Boussoulim et al., 2011).



**Figure 1 :** Droite d'absorbance de la pénicilline G (200  $\mu$ M) en présence de la  $\beta$ -lactamase en fonction du temps.

### II.2. La détermination des paramètres cinétiques

L'ensemble des cinétiques enzymatiques du substrat et les inhibiteurs sont réalisées par une méthode spectrophotométrique. L'activité enzymatique est mesurée par la diminution de l'absorbance à une longueur d'onde spécifique pour la Pénicilline G ( $\lambda=235\text{nm}$ ) (Rossolini et al, 1999). Les paramètres cinétiques ( $K_m$ ,  $V_{max}$ ) sont déterminés par la représentation de Michaelis-Menten, Hanes-Woolf et Lineweaver-Burk grâce au logiciel « SIGMAPLOT 10.0 » auquel le module « Enzyme Kinetics 1.1 » a été ajouté.

Une solution de substrat (Pénicilline G) avec des concentrations finales de 10 à 200  $\mu$ M sont préparées dans un tampon phosphate 0,1 M, pH 7,1. A chaque concentration, 10 UI de la solution enzymatique est ajoutée et la variation de l'absorbance est suivie à 25°C. Les vitesses initiales d'hydrolyse en  $\mu$ mol/min/mg sont calculées et les paramètres cinétiques sont déterminés. La valeur de l'activité spécifique est la moyenne de trois mesures  $\pm$  SD.

### II.3. Les tests d'inhibition de la $\beta$ -lactamase

#### II.3.1. L'évaluation de l'effet des flavonoïdes sur l'activité du $\beta$ -lactamase

L'effet inhibiteur des flavonoïdes sur l'activité de la  $\beta$ -lactamase a été étudié spectrophotométriquement en suivant la quantité de la pénicilline G consommée par hydrolyse de  $\beta$ -lactamase dissous dans un tampon phosphate 0,1 M, pH 7,1 avec un volume final de 500  $\mu$ l, et en

présence de plusieurs concentrations de chaque molécule. L'enzyme est préincubée avec la solution d'inhibiteur pendant 10 minutes à 25°C. La réaction est initiée par l'addition de la solution de pénicilline G, puis la diminution de l'absorbance à 235 nm est suivie pendant 30 secondes. L'activité inhibitrice de ces molécules a été comparée par rapport au témoin qui ne contient pas d'inhibiteur. La valeur de l'activité enzymatique est la moyenne de trois mesures  $\pm$  SD. Après ajout de la  $\beta$ -lactamase la réaction a été exprimée en pourcentage d'inhibition (I%) calculé en suivant la formule:  $I\% = (V_{it} - V_{ie} / V_{it}) \times 100$  ( $V_{it}$  : l'activité de l'enzyme dans le puits témoin,  $V_{ie}$  : la vitesse initiale de l'enzyme dans le puits contenant le flavonoïdes).

### II.3.2. La détermination du type d'inhibition

La détermination du type d'inhibition est réalisée en présence de concentrations croissantes de pénicilline G (10 à 200  $\mu$ M) et de concentration fixe d'inhibiteur (150 $\mu$ M). Il s'agit du même protocole décrit dans la partie précédente. Les inhibiteurs testés sont : épicatechine, catéchine, naringine, morine, rutine. Les paramètres cinétiques sont aussi déterminés par la représentation de Lineweaver-Burk et Hanes-Woolf grâce au logiciel « SIGMAPLOT 12.5 » auquel le module « Enzyme Kinetics 1.1 » a été ajouté. Les vitesses initiales de la réaction en  $\mu$ mol/min sont calculées et le type d'inhibition est déterminé. La valeur de l'activité enzymatique est la moyenne de trois mesures  $\pm$  SD.

## III. Results and Discussion

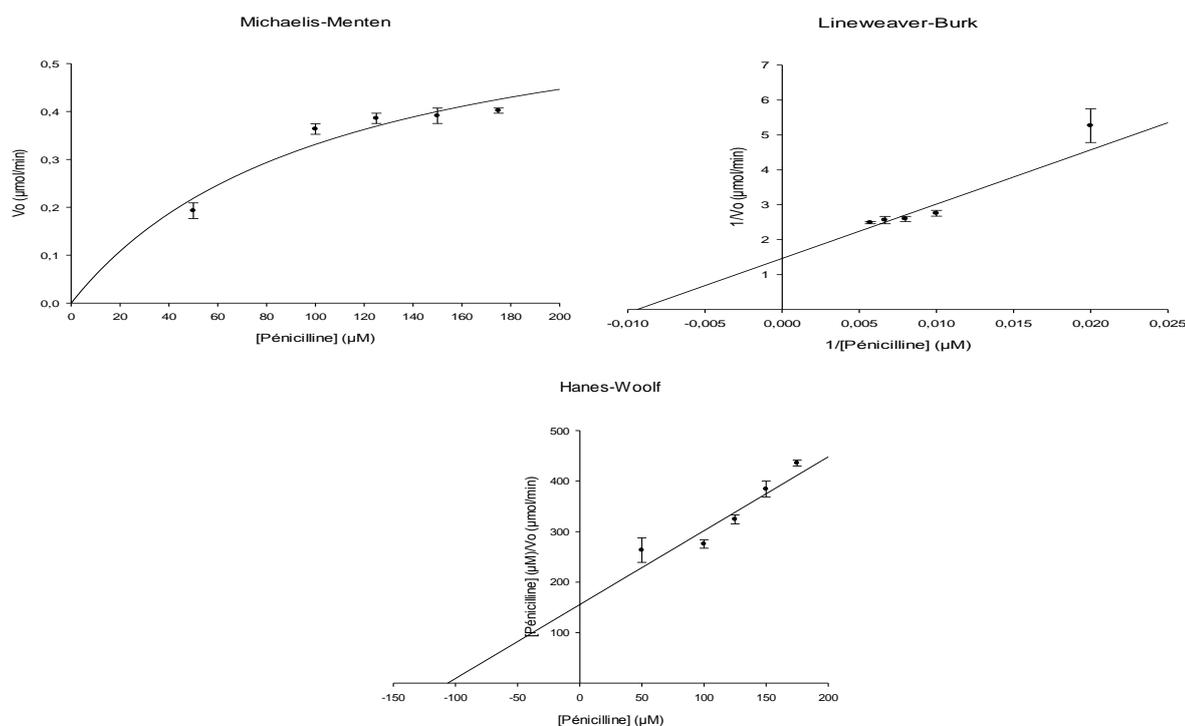
### III. 1. La détermination des paramètres cinétiques

Après le suivi de l'absorbance de la pénicilline G avec des concentrations croissantes (10 à 200  $\mu$ M) et en présence de 10 UI de l'enzyme à 235 nm, on a trouvé que la pénicilline G est très sensible à l'enzyme, et que la vitesse initiale augmente avec l'augmentation de la concentration de la pénicilline G (Tableau 1).

**Tableau 1** : Les vitesses initiales ( $V_0$ ) de l'hydrolyse de la pénicilline G (10 à 200  $\mu$ M) en présence de la  $\beta$ -lactamase.

[Pénicilline G] $\mu$ M	vitesse initiale ( $V_0$ ) $\mu$ mole/min			Moyenne
	$V_{01}$	$V_{02}$	$V_{03}$	
10	0,00642857	0,00857143		0,0075
25	0,075	0,06428571		0,06964286
50	0,20357143	0,21428571	0,16071429	0,19285714
75	0,21428571	0,19285714	0,20357143	0,20357143
100	0,38265306	0,34438776	0,36352041	0,36352041
125	0,375	0,39642857		0,38571429
150	0,375	0,40714286		0,39107143
175	0,40714286	0,39642857		0,40178571
200	0,55714286	0,6		0,57857143

En utilisant la représentation de Michaelis-Menten, Hanes-Woolf et Lineweaver-Burk avec ces différentes concentrations de substrat à 25°C et à pH 7,1 (Figure 2), on a déterminé les paramètres cinétiques suivants : constante de Michaelis et Menten ( $K_m$ ) et la vitesse maximale ( $V_{max}$ ). Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 2



**Figure 2 :** Représentations de Michaelis-Menten, lineweaver-Burk et Hanes-Woolf de la  $\beta$ -lactamase avec la pénicilline G comme substrats.

**Tableau 2 :** paramètres cinétiques de la  $\beta$ -lactamase de *Bacillus cereus*

Substrat	Km ( $\mu\text{M}$ )	Vmax ( $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ )
Pénicilline G	106,3256 $\pm$ 32,0861	0,6836 $\pm$ 0.00974

### III. 2. Les tests d'inhibition de la $\beta$ -lactamase

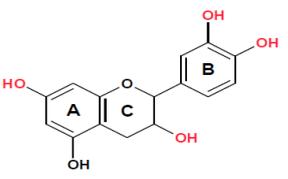
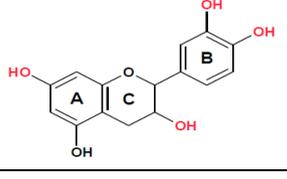
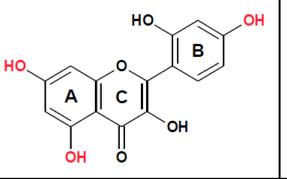
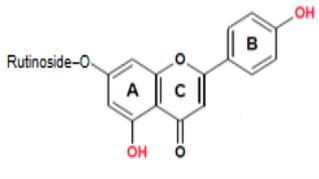
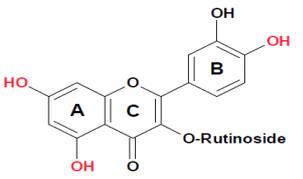
#### III. 2. 1. Evaluation de l'effet des flavonoïdes sur l'activité de la $\beta$ -lactamase

L'objectif de cette partie de notre travail est d'évaluer l'effet inhibiteur d'un certain nombre de flavonoïdes sur la  $\beta$ -lactamase d'une souche de *Bacillus cereus* et d'établir une relation structure-fonction. L'activité enzymatique est testée en présence de 3 à 4 concentrations croissantes de chaque flavonoïde. Les pourcentages d'inhibition sont représentés dans le Tableau 3.

**Tableau 3 :** les pourcentages d'inhibition des flavonoïdes, (Nd) : non déterminé

Flavonoïdes	% d'inhibition			
	10 $\mu\text{M}$	20 $\mu\text{M}$	150 $\mu\text{M}$	200 $\mu\text{M}$
01 Epicatéchine	0	20.31	28.57	Nd
05 Naringénine	0.72	8.63	5.41	9.67
06 Catéchine	0.39	13.11	25.85	Nd
07 Morine	5.72	15.40	62.33	Nd
08 Rutine	6.97	12.27	45.81	Nd
09 Naringine	10.79	1.52	34.82	Nd

**Tableau 4 :** Type d'inhibition et les constantes d'inhibition (Ki) des flavonoïdes.

Flavonoïdes	Structure	Ki (µM)	Type d'inhibition
Catéchine		541,3432±169,1247	Compétitif
Epicatechine		57,4735±25,9272	Incompétitif
Morine		68,1107±14,5320	Compétitif
Naringine		161,1063±72,6817	Incompétitif
Rutine		79,9980±17,4805	Compétitif

La mesure de l'activité de la  $\beta$ -lactamase en présence de différentes concentrations (10, 20, 150 et 200 mg/ml) des flavonoïdes montre que ces derniers inhibent l'activité enzymatique. Le pourcentage d'inhibition est déterminé pour chaque concentration (Tableau 3). Dans l'intervalle de concentrations de 10 à 150 mg/ml, l'inhibition est passée de 0,72 % jusqu'à 5,41% pour la naringénine, et même à une concentration de 200 mg/ml l'activité reste faible, donc cette molécule n'a pas un effet inhibiteur même à des concentrations élevés. L'épicatechine et la catéchine ont des taux d'inhibition plus ou moins intermédiaire à 150 mg/ml avec des pourcentages d'inhibition de 28,57% et 25,85%, respectivement. Concernant la morine, la rutine et la naringine, elles ont le taux d'inhibition le plus élevé à 150 mg/ml avec des pourcentages d'inhibition 62,33%, 45,81% et 34,82% respectivement.

### III. 2. 2. La détermination du type d'inhibition

Afin d'établir une relation entre les structures chimiques des flavonoïdes et leur activité inhibitrice, nous avons déterminé le type d'inhibition et la constante d'inhibition (Ki) pour chaque molécule en utilisant la représentation de Lineweaver-Burk et Hanes-Woolf. Les résultats sont présentés dans le Tableau 4.

En utilisant la représentation de Lineweaver-Burk et Hanes-Woolf, nous avons déterminé le type d'inhibition et la constante d'inhibition ( $K_i$ ) pour chaque molécule dans le but d'établir une relation entre les structures chimiques des flavonoïdes testés et leurs activités inhibitrices.

En comparant ces flavonoïdes avec l'acide clavulanique ou la pénicilline G, on trouve une analogie structurale au niveau du groupement 4 oxo. On peut supposer que cette fonction est essentielle pour l'inhibition. Cette fonction est présente chez l'ensemble des flavonoïdes qui ont un effet inhibiteur. Cependant, la catéchine et l'épicatéchine, qui n'ont pas cette fonction, présentent un effet plus au moins remarquable. Nous avons testé (Boussoulim et al., 2011) l'effet inhibiteur de 17 flavonoïdes sur une  $\beta$ -lactamase type TRI;  $\beta$ -lactamase résistante à l'acide clavulanique isolé d'une souche clinique *E. coli*. Les résultats ont montré que le type l'inhibition des flavonoïdes est incompétitif et non compétitif. Les polyphénols ne présentent aucun effet inhibiteur. Les constantes d'inhibition ( $K_i$ ) sont pour la plupart des molécules supérieures à 100  $\mu\text{M}$ , c'est-à-dire 200 fois moins efficaces que l'acide clavulanique ( $K_i = 0.5 \mu\text{M}$ ). Cependant, Gangoué-Piéboj et ses collaborateurs (2007) ont étudié 16 plantes camerounaises et ont évalué leur activité anti- $\beta$ -lactamase. L'enquête a montré qu'il y a quelques extraits qui présentent une activité inhibitrice importante sur TEM-1, OXA-10, IMP-1 et P99 avec des pourcentages d'inhibition de 90%. Les informations phytochimiques sur les plantes testées sont limitées. Peu d'étude sur l'activité inhibitrice des  $\beta$ -lactamases par des composés issus des plantes ont été publiées.

A l'opposé des inhibiteurs suicides (acide clavulanique, tazobactam et sulbactam) inhibant les  $\beta$ -lactamases de manière compétitive, les flavonoïdes l'épicatéchine et la naringine inhibent la  $\beta$ -lactamase de *Bacillus cereus* de manière incompétitive. Tandis que la catéchine, la morine et la rutine sont des inhibiteurs compétitifs. Ceci est surprenant vu l'homologie structurale entre toutes ces molécules. La position des hydroxyles (-OH) est sans doute responsable du type d'inhibition. En effet, les flavonoïdes qui sont incompétitifs ont des OH dans les positions C5 et C4' alors que celles qui sont compétitif ont des OH placés dans les positions C5, C7 et C4'. L'hydroxyle (-OH) en position C7 semble pouvoir à lui modifier l'interaction du flavonoïde avec la  $\beta$ -lactamase et ainsi le type d'inhibition mais aussi la position de OH ( $\alpha$  ou  $\beta$ ) et du sucre joue un rôle majeure dans la modification de type d'inhibition, ceci a été mentionné dans le cas de la catéchine, l'épicatéchine, la rutine et la naringine. Les deux premières molécules ont la même structure mais deux différents types d'inhibition à cause de la position  $\alpha$  ou  $\beta$  du OH (la catéchine a un OH en C3 avec une position  $\beta$ , et l'épicatéchine a aussi un OH en C3 mais cette fois la avec une position  $\alpha$ ), et les deux molécules qui restent, la rutine et la naringine ont le même polysaccharide (rutinoside-glucose) mais dans des position différentes (la rutine a un polysaccharide dans la position C3 et de la naringine dans la position C7) (Tim Cushnie et Lamb, 2005). En effet, il a été rapporté que le flavonoïde épigallocatechine gallate inhibe l'activité d'une pénicillinase, rétablissant ainsi l'activité antibactérienne de la pénicilline contre *S. aureus* (Zhao et al., 2002).

La fonction 4 oxo du cycle C a une importance dans l'inhibition. Si on compare la catéchine et la naringine, le  $K_i$  est réduit de plus d'un tiers, le même résultat pour la morine et la rutine (diminution du  $K_i$ ). Donc la présence de cette fonction à une importance moindre, puisque son absence augmente l'effet inhibiteur de la catéchine, le même résultat a été mentionné par Boussoulim et ses collaborateurs (2011). D'autre part, la position  $\alpha$  ou  $\beta$  de l'hydroxyle (-OH) en C3 modifie aussi le  $K_i$ , qui a été mentionné dans le cas du catéchine et l'épicatéchine, la position  $\beta$  de l'hydroxyle (-OH) en C3 pour la catéchine donne un effet presque dix fois plus que l'effet dans le cas de la position  $\alpha$  de l'hydroxyle (-OH) en C3 pour l'épicatéchine.

Les polyphénols et flavonoïdes ont montré une modeste activité sur les  $\beta$ -lactamases en les comparant aux inhibiteurs spécifiques. Concernant la comparaison du  $K_i$  de ces flavonoïdes ( $K_i$  à une concentration de 150  $\mu\text{M}$ ) avec celle des inhibiteurs spécifiques qui sont caractérisés par des constantes d'inhibition  $K_i$  de 0.1  $\mu\text{M}$ , 0.9  $\mu\text{M}$  et 0.01  $\mu\text{M}$ , respectivement pour l'acide clavulanique, sulbactam et tazobactam (Boussoulim et al, 2011 ; Chaibi et al, 1999 ; Yang et al, 1999) à des concentrations très faibles, l'affinité des inhibiteurs spécifiques au  $\beta$ -lactamase est plus élevé de celle des flavonoïdes. Une autre étude réalisée par Deny et ses collaborateurs (2002) sur des métallo- $\beta$ -lactamases partiellement purifiée à partir de *Stenotrophomonas maltophilia*, a montré que les flavonoïdes étudiés ont une activité inhibitrice moyenne. Des études antérieures ont montré des résultats semblables. Yang et ses collaborateurs (2010) ont testé l'effet inhibiteur de l'acide salicylique sur une  $\beta$ -lactamase extraite à partir d'une souche nosocomiale de *Pseudomonas aeruginosa* G19. Cette molécule a montré une  $\text{IC}_{50}$  de 71.77 mM. Il s'agit d'un inhibiteur légèrement puissant en le

comparant aux inhibiteurs spécifiques des  $\beta$ -lactamases. En conclusion, les molécules testées ont une activité inhibitrice relativement faible et la découverte d'une molécule candidate doit passer inévitablement par l'évaluation d'un grand nombre de flavonoïdes.

#### IV. Conclusion

D'après les resultants trouvés, nous constatons que *Bacillus cereus* est parmi les agents pathogènes qui résiste à la pénicilline G en produisant des enzymes, des  $\beta$ -lactamases, de type pénicillinase. L'évaluation de certains flavonoïdes comme alternative aux inhibiteurs classiques (acide clavulanique, sulbactam et tazobactam), montre une certaine limite. Ces molécules sont faiblement inhibitrices ( $K_i$  à une concentration de 150  $\mu$ M) agissant de manière compétitive et incompétitive. Cette inhibition est d'une importance clinique moindre car ces flavonoïdes restent beaucoup moins efficaces que les inhibiteurs classiques.

#### V. References

- Boussoualim N, Meziane-cherif DJ, Baghiani A. (2011). Kinetic study of different flavonoids as inhibitors of beta-lactamase enzyme. *African Journal of Biochemistry Research* Vol. 5(10), pp. 321-327
- Chaibi E.B, Sirot D, Paul G and Labia R. Inhibitor-resistant TEM  $\beta$ -lactamases: Phenotypic, genetic and biochemical characteristics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 43: 447-458, 1999.
- Deny BJ, Lambert PA, West PWJ. 2002. The flavonoid galangin inhibits the L1 metallo- $\beta$ -lactamase from *Stenotrophomonas maltophilia*. *FEMS Microbiology Letters* 208: 21-24
- Finberg RW, Guharoy R. 2012. Penicillins, Chapitre 4. Dans: Clinical use of anti-infective agents: A Guide on how to prescribe drugs used to treat infections, Springer Science+Business Media, LLC. pp.
- Gangoué-Piéboji J, Baurin S, Frère JM, Ngassam P, Ngameni B, Azebaze A, Emmanuel Pegnyem D, Watchueng J, Goffin C, Galleni M. 2007. Screening of some medicinal plants from Cameroon for  $\beta$ -lactamase inhibitory activity. *Phytotherapy research*. 21, 284-287.
- Page MGP. 2012. Beta-lactam antibiotics. Chapitre 3. Dans: Antibiotic Discovery and Development, Springer Science+Business Media, LLC. pp.79-111.
- Rossolini G.M, Franceschini N, Lauretti L, Caravelli B, Riccio M.L, Galleni M, Frère J-M and Amicosante G. Cloning of a *Chryseobacterium (Flavobacterium) meningosepticum* Chromosomal Gene (blaACME) encoding an extended-spectrum class A  $\beta$ -lactamase related to the *Bacteroides* cephalosporinases and the VEB-1 and PER  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother*, 43(9): 2193–2199, 1999.
- Tim Cushnie TP, Lamb AJ. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal. Antimicrobial Agents* 26: 343-356.
- Yang Y, Niu Y, Le Y, Ma X, Qiao CH. 2010. Beta-lactamase inhibitory component from the roots of *Fissistigma cavaleriei*. *Phytomedicine* 17 : 139-141.
- Yang Y, Rasmussen B.A and Shlaes D.M. Class A  $\beta$ -lactamases—enzyme-inhibitor interactions and resistance. *Pharmacology and Therapeutics*, 83: 141-151, 1999.
- Zhao WH, Hu YQ, Hara Y, Shimamura T. 2002. Inhibition of penicillinase by epigallocatechin gallate resulting in restoration of antibacterial activity of penicillin against penicillinase-producing *staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. pp. 2266–2268

#### Please cite this Article as:

Boussoualim N., Kebabi M., Benmila A., Krache I., Arrar L. and Baghiani A., Effet de quelques flavonoïdes sur une pénicillinase de *Bacillus cereus*, *Algerian J. Nat. Products*, 5:3 (2017) 541-547

Access this article online	
Website: <a href="http://www.univ-bejaia.dz/ajnp">www.univ-bejaia.dz/ajnp</a>	Quick Response Code
DOI: <a href="https://doi.org/10.5281/zenodo.1130838">https://doi.org/10.5281/zenodo.1130838</a>	