



UNIVERSITÉ D'ABOMEY-CALAVI
FACULTÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES
ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE



THÈSE

Présentée par:

ANAGO Ahoéfa Amélé Eugénie

Pour l'obtention du Grade de
Docteur de l'Université d'Abomey-Calavi

Spécialité: Biochimie

**ACTIVITÉS ANTIBACTÉRIENNES DE QUELQUES PLANTES
DE LA PHARMACOPÉE AFRICAINE SUR DES SOUCHES DE
ESCHERICHIA COLI PRODUCTRICES DE BÊTA-
LACTAMASES**

Soutenue le **25 Juillet 2009** devant le Jury composé de :

- Président :** Messan F. GBEASSOR, Professeur à la Faculté des Sciences de l'Université de Lomé, Togo
- Rapporteurs :**
- Fatiou TOUKOUROU, Maître de Conférences à la Faculté des Sciences et Techniques de l'Université d'Abomey-Calavi, Bénin
 - Innocent GUISSOU, Professeur à l'Unité de Formation et de Recherche en Sciences de la Santé de l'Université de Ouagadougou, Burkina Faso
- Examineur:** Mansourou MOUDACHIROU, Professeur à la Faculté des Sciences et Techniques de l'Université d'Abomey-Calavi, Bénin
- Directeur de thèse:** Frédéric LOKO, Maître de Conférences à l'Ecole Polytechnique de l'Université d'Abomey-Calavi, Bénin

**"Le Seigneur fit pour moi
des merveilles; Saint est son nom! "**

Cantique de Marie, Luc 1:49

DÉDICACE

A toi mon Terence,

Ta présence dans ma vie est un motif d'actions de grâces permanentes. Puissent les fruits de ce travail te dédommager quelque peu des privations que tu as eu à subir pour sa réalisation.

A Pascal, Flavien, Anani, Aurella,

Merci pour votre présence affectueuse dans laquelle j'ai puisé la force et la détermination nécessaire à l'accomplissement de ce travail.

REMERCIEMENTS

A mes parents,

pour tant d'affection, de dévouement, de don de soi... Merci de m'avoir inculqué l'amour du travail bien fait, le sens de la dignité, d'avoir éveillé en moi la soif de la Connaissance.

A mes frères et sœurs,

pour votre soutien, votre disponibilité, vos critiques quand il le fallait. Merci pour tant d'affection.

A Sarah AFAN ,

pour avoir aidé mes parents à s'occuper de mon fils en mon absence, tu as facilité la réalisation de ce travail. Merci infiniment.

A "mémé" Modukpè Aichatou BIO TCHANE,

à ses enfants et toute sa famille pour m'avoir soutenue, encouragée, réconfortée durant la réalisation de ce travail. Merci pour les prières.

A mes beaux-frères Arnaud et Christian, à mes oncles, tantes, cousins et cousines pour votre disponibilité et vos encouragements.

A mes aînés Mr Hyacinthe AHISSOU et Madame Lucie AYI, pour les conseils, les mots d'encouragement, le partage de la Parole.

Au personnel du Centre d'Information et de Recherche en Santé de la Reproduction (CIRSAR) où j'ai réalisé la majeure partie des travaux, merci pour l'amitié dont vous m'avez gratifiée et pour votre sollicitude.

Au Pr Joachim GBENOU, au Dr Fernand GBAGUIDI, au Pr Léon AHOUSSE, à Madame Marthe ZINSOU, au personnel et à tous les stagiaires du Laboratoire de Pharmacognosie et des Huiles essentielles (FAST/FSS), pour votre disponibilité et votre sollicitude lors de mes travaux.

Au Dr Latifou LAGNIKA, à Mr Patrice AVOGBE, à Mr Tagnon MISSINHOUN, au Dr Nicodème CHABI, au Pr Lamine BABA-MOUSSA, au Dr Lucie AYI du Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire (FAST), pour les échanges intéressants. Merci de m'avoir traitée comme un membre de votre équipe de recherche.

Au Dr AHOYO Angèle (EPAC), pour la franche et fructueuse collaboration.

Au Dr Nouratou ALI (EPAC) pour son aide.

Au Pr Akpovi AKOEGNINO, au Dr Paul YEDOMOHAN et tout le personnel de l'Herbier National pour leur collaboration.

Au personnel du Département de TBH/EPAC, pour le soutien et les encouragements.

Au Dr Soumanou TOLEBA, pour sa contribution dans le démarrage de ce travail, ma profonde gratitude.

A mes aînés, collègues et amis qui m'ont soutenue et encouragée :

Mr Marius ADJAGBA, Pr-ag Anatole LALEYE, Mme Safiath BIONIGAN, Pr Mohamed SOUMANOU Mme Rose Marie ALOCHEKPA, Dr Pierre DOSSOU-YOVO, Dr Evelyne LOZES, Mr Richard FEHICHITAN, Pr Patrick EDORH.

REMERCIEMENTS

Au Professeur Frédéric LOKO, directeur de thèse, j'adresse toute ma gratitude et ma reconnaissance pour m'avoir proposé ce sujet intéressant et pour m'avoir fait bénéficier d'un encadrement soutenu au cours de mes travaux de recherche.

Au Professeur Mansourou MOUDACHIROU, qui m'a permis de réaliser la partie phytochimique de ce travail dans son laboratoire, j'adresse ma profonde gratitude pour sa sollicitude, sa disponibilité et ses précieux conseils lors de la finalisation de ce document.

Au Professeur Ambaliou SANNI, pour m'avoir acceptée dans son laboratoire où j'ai réalisé la partie biologie moléculaire de ce travail, j'adresse ma vive gratitude et ma profonde reconnaissance.

Aux membres du Jury, j'adresse ma profonde gratitude pour leur contribution à l'amélioration de ce travail.

Ce travail a été en partie financé par le Centre Béninois de la Recherche Scientifique et Technique (CBRST) auquel j'exprime ma gratitude.

TABLE DES MATIÈRES

ABRÉVIATIONS	1
INTRODUCTION	4
PREMIÈRE PARTIE : GÉNÉRALITÉS	8
1. LES ANTIBIOTIQUES ET LA RÉSISTANCE BACTÉRIENNE	9
1.1 Les bêta-lactamines	9
1.1.1. Les pénicillines	10
1.1.2. Les céphalosporines	11
1.1.3. Les carbapénèmes et les monobactames	12
1.1.4. Mode d'action des bêta-lactamines et résistance bactérienne aux bêta-lactamines	12
1.2. Les aminosides	13
1.3. Les quinolones	14
1.4. Les cyclines	15
1.5. Les sulfamides et les diaminopyridines	15
1.6. Autres antibiotiques	16
1.7. Bases génétiques de la résistance bactérienne aux antibiotiques	17
1.7.1. La résistance naturelle	18
1.7.2. La résistance acquise	18
1.7.3. Propagation de la résistance aux antibiotiques	19
2. LES ENZYMES DE RÉSISTANCE AUX BÊTA-LACTAMINES : LES BÊTA-LACTAMASES	21
2.1. Classifications des bêta-lactamases	22
2.1.1. Définition et origine des BLSE	23
2.1.2. Les non-BLSE	24
2.2. Les différents types de BLSE	24
2.2.1. Le type TEM	24
2.2.2. Le type SHV	25
2.2.3. Le groupe CTX-M	26

2.2.4. Le groupe OXA	27
2.2.5. Les bêta-lactamases de type IRT	27
2.2.6. Autres BLSE	27
2.3. Méthodes de détection des bêta-lactamases	28
2.3.1. Méthodes microbiologiques	28
2.3.2. Méthodes biochimiques	30
2.3.3. Méthodes de la biologie moléculaire	31
3. <i>ESCHERICHIA COLI</i>	35
3.1. Caractéristiques	35
3.2. Pathologies liées à <i>Escherichia coli</i>	35
3.2.1. Les entérites	36
3.2.2. Les septicémies et les méningites néonatales	37
3.2.3. Les infections urinaires	37
3.2.4. Traitement des infections du tractus urinaire	38
3.3. Résistance de <i>Escherichia coli</i> aux bêta-lactamines	40
4. GÉNÉRALITÉS SUR LES ESPÈCES VÉGÉTALES À ACTION ANTIMICROBIENNE UTILISÉES	40
4.1. Données botaniques et ethnopharmacologiques sur les espèces végétales utilisées	41
4.2. Propriétés biologiques et pharmacologiques de quelques composés phytochimiques	48
4.2.1. Les alcaloïdes	48
4.2.2. Les dérivés anthracéniques	48
4.2.3. Les coumarines	48
4.2.4. Les saponosides	49
4.2.5. Les tanins	49
4.2.6. Les mucilages	50
4.2.7. Les flavonoïdes	50
4.2.8. Les terpènes et stéroïdes	51
4.2.9. Les hétérosides cardiotoniques	51
4.3. Structure chimique de quelques composés phytochimiques	51

DEUXIÈME PARTIE : INHIBITION DE LA CROISSANCE DES SOUCHES DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> PAR LES EX- TRAITS TOTAUX ÉTHANOLIQUES DE PLANTES	55
CHAPITRE 1 : CADRE, MATÉRIEL ET MÉTHODES	56
1. CADRE	57
2. MATÉRIEL	57
2.1. Matériel végétal	57
2.2. Souches bactériennes	57
2.3. Milieux de culture	58
2.4. Disques d'antibiotiques	58
2.5. Réactifs pour l'amplification génique	58
3. MÉTHODES	59
3.1. Méthodes phytochimiques	59
3.1.1. Préparation des extraits totaux éthanoliques	59
3.1.2. Recherche des principales classes de composés phytochimiques	60
3.1.2.1. Recherche des alcaloïdes	60
3.1.2.2. Recherche des tannins	61
3.1.2.3. Mise en évidence des flavonoïdes	62
3.1.2.4. Détection des anthocyanes et leucoanthocyanes	62
3.1.2.5. Recherche des dérivés quinoniques	62
3.1.2.6. Mise en évidence des dérivés anthracéniques	62
3.1.2.7. Recherche des stéroïdes et terpénoïdes	63
3.1.2.8. Recherche des dérivés cyanogénétiques	64
3.1.2.9. Mise en évidence de saponosides	64
3.1.2.9. Recherche des mucilages	65
3.1.2.10. Mise en évidence des coumarines	65
3.1.2.11. Recherche des composés réducteurs	65
3.2. Méthodes microbiologiques	65
3.2.1. Collecte des souches de <i>Escherichia coli</i>	65
3.2.1.1. Population d'étude	65

3.2.1.2. Prélèvement	66
3.2.1.3. Examen et ensemencement	66
3.2.1.4. Interprétation de l'uroculture	66
3.2.2. Caractérisation microbiologique des souches	67
3.2.2.1. Antibiogrammes des souches de <i>Escherichia coli</i>	67
3.2.2.2. Détection de bêta-lactamases	68
3.2.2.3. Mise en évidence des BLSE	68
3.2.2.4. Études statistiques	69
3.3. Caractérisation des souches par les méthodes de la biologie moléculaire	69
3.3.1. Extraction de l'ADN des souches de <i>Escherichia coli</i>	69
3.3.2. L'amplification génique	69
3.3.3. Recherche du gène bla _{TEM}	70
3.3.4. Mise en évidence du gène bla _{SHV}	70
3.3.5. Recherche des gènes de la famille CTX-M	70
3.4. Tests d'inhibition de la croissance des souches de <i>Escherichia coli</i>	71
3.4.1. Préparation des extraits éthanoliques	71
3.4.2. Réalisation de la suspension bactérienne	71
3.4.3. Expression des résultats	71
3.5. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des extraits de plante sur des souches de <i>E. coli</i>	72
3.5.1. Préparation de la gamme de dilutions des extraits végétaux	72
3.5.2. Détermination des CMI des extraits végétaux	72
CHAPITRE 2: RÉSULTATS	73
1. CARACTÉRISATION DES SOUCHES DE <i>E. coli</i>	74
1.1. Tests de détection des bêta lactamases	74
1.2. Phénotype de résistance des souches aux antibiotiques	75
1.4. Recherche des gènes de bêta-lactamases	76
1.4.1. Recherche des gènes de type TEM	76

1.4.2. Recherche des gènes de type SHV et CTX-M	77
2. ÉTUDE DES ACTIVITÉS ANTIBACTÉRIENNES DE 38 ESPÈCES VÉGÉTALES SUR DES SOUCHES DE <i>E. COLI</i> PRODUCTRICES DE BÊTA-LACTAMASES	79
2.1. Inhibition de la croissance d'une souche de <i>E. coli</i> non BLSE de type TEM	80
2.2. Inhibition de la croissance d'une souche de <i>E. coli</i> productrice de BLSE de type TEM	82
2.3. Inhibition de la croissance de 30 souches productrices de bêta-lactamases par les extraits totaux de 4 espèces végétales	85
2.4. CMI de <i>Boswellia dalzielii</i> et de <i>Terminalia superba</i> sur trois souches de <i>E. coli</i>	86
3. CRIBLAGE PHYTOCHIMIQUE DES ESPÈCES VÉGÉTALES INHIBANT A 100% LA CROISSANCE DE LA SOUCHE BLSE	87
3.1. Rendements des extraits totaux éthanoliques	87
3.2. Détermination des principales classes de composés phytochimiques	88
CHAPITRE 3: DISCUSSION	91
TROISIÈME PARTIE : ÉTUDE BIOCHIMIQUE DES BÊTA-LACTAMASES EXTRAITES DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> ET INHIBITION PAR LES EXTRAITS TOTAUX ÉTHANOLIQUES DE PLANTES	104
CHAPITRE 1 : CADRE, MATÉRIEL ET MÉTHODES	105
1. CADRE	106
2. MATÉRIEL	106
3. MÉTHODES	106
3.1. Détermination de l'activité enzymatique des bêta-lactamases extraites des souches de <i>E. coli</i>	106

3.1.1. Extraction des bêta-lactamases et détermination qualitative de l'activité bêta-lactamase	107
3.1.2. Détermination de la longueur d'onde d'absorption optimale pour la mesure de l'activité bêta-lactamase dans le visible	108
3.1.2.1. Spectre d'absorption du substrat benzylpénicilline	108
3.1.2.2. Spectre d'absorption du produit d'hydrolyse du substrat par la bêta-lactamase	108
3.1.2.3. Spectre d'absorption du rouge de phénol	108
3.1.2.4. Spectre d'absorption du rouge de phénol après hydrolyse de la benzylpénicilline	109
3.1.3. Détermination de l'activité bêta-lactamase	109
3.1.3.1. Principe	109
3.1.3.2. Détermination du coefficient d'extinction molaire ϵ	110
3.1.3.3. Cinétique enzymatique de la bêta-lactamase	111
3.2. Détermination du pHi des bêta-lactamases par chromatofocalisation	111
3.2.1. Chromatofocalisation des extraits bruts de bêta-lactamases	111
3.2.2. Mesure de l'hydrolyse de la benzylpénicilline en UV	112
3.2.1.1. Détermination de la longueur d'onde d'absorption optimale	112
3.2.1.2. Cinétique enzymatique dans l'UV	112
3.3. Inhibition des extraits bruts de bêta-lactamases par des extraits d'organes de plantes de la pharmacopée africaine	113
CHAPITRE 2: RÉSULTATS	115
1. MISE AU POINT DE LA DÉTERMINATION L'ACTIVITÉ BÊTA-LACTAMASE DANS LE VISIBLE	116
1.1. Extraction de la bêta lactamase de <i>E . coli</i>	116
1.2. Longueur d'onde d'absorption optimale	116
1.2.1. Spectre d'absorption du substrat et de son produit d'hydrolyse par la bêta lactamase	116

1.2.2. Spectre d'absorption du rouge de phénol avant et après hydrolyse de la benzylpénicilline	117
1.3. Détermination de l'activité enzymatique	118
1.3.1. Gamme d'étalonnage du substrat-réactif et détermination du coefficient d'extinction molaire ϵ du rouge de phénol	118
1.3.2. Cinétique des activités des extraits bruts de bêta-lactamases dans le visible	119
2. CHROMATOFOCALISATION DES EXTRAITS BRUTS DE BÊTA-LACTAMASES	120
2.1. Détermination de l'activité enzymatique dans l'ultraviolet (UV)	120
2.2. Profil d'élution des bêta-lactamases par chromatofocalisation	122
3. INHIBITION DES BÊTA-LACTAMASES PAR LES EXTRAITS D'ORGANES DE PLANTES	125
3.1. Inhibition de l'extrait brut de non BLSE par les extraits totaux éthanoliques de plantes	123
3.2. Inhibition de l'extrait brut de BLSE par les extraits totaux éthanoliques de plantes	126
3.3. Tests d'inhibition de la bêta-lactamase par extraits de plante sans action inhibitrice sur la croissance de la souche de <i>E. coli</i> non BLSE	127
CHAPITRE 3: DISCUSSION	128
QUATRIÈME PARTIE : ÉTUDE PHYTOCHIMIQUE ET PROPIÉTÉS ANTIBACTÉRIENNES DE <i>TERMINALIA SUPERBA</i> (COMBRETACEAE)	134
CHAPITRE 1 : MATÉRIEL ET MÉTHODES	135
1. CADRE	136
2. MATÉRIEL BIOLOGIQUE	136

3. MÉTHODES	136
3.1. Techniques utilisées	136
3.1.1. Réalisation des extraits	136
3.1.2. Analyse par CCM	137
3.2. Analyse phytochimique des organes de <i>Terminalia superba</i>	138
3.2.1. Analyse par CCM de composés mis en évidence par le criblage phytochimique	138
3.2.1.1. Détection des composés anthracéniques	138
3.2.1.2. Détection des coumarines	138
3.2.2. Réalisation des extraits totaux	139
3.2.2.1. Extraits totaux aqueux	139
3.2.2.2. Extraits totaux éthanoliques	139
3.2.2.3. Extraits totaux méthanoliques	140
3.2.3. Extraction par polarité croissante de solvants	140
3.2.4. Réalisation des extraits spécifiques	141
3.2.4.1. Extraction spécifique des dérivés anthracéniques	141
3.2.4.2. Extraction spécifique des coumarines	141
3.2.4.3. Extraction spécifique des mucilages	142
3.2.4.4. Extraction spécifique des tanins	142
3.3. Détermination de la CMI et de la CMB sur des souches de <i>E. coli</i>	144
3.3.1. Détermination de la CMI	144
3.3.2. Détermination de la CMB	145
CHAPITRE 2 : RÉSULTATS	146
1. RÉSULTATS DE L'ANALYSE PAR CCM DES EXTRAITS DES TROIS ORGANES DE <i>TERMINALIA SUPERBA</i>	147
1.1. Détection des dérivés coumariques	147
1.2. Détection des anthracéniques	148

2. RENDEMENTS DES DIFFÉRENTES EXTRACTIONS	149
2.1. Extraits totaux et par polarité croissante de solvants	149
2.2. Extraits spécifiques des écorces de <i>Terminalia superba</i>	150
3. TESTS ANTIBACTÉRIENS AVEC LES EXTRAITS D'ORGANES DE <i>TERMINALIA SUPERBA</i>	151
3.1. Détermination de la CMI sur des souches de <i>E. coli</i>	151
3.1.1. Extraits totaux	151
3.1.2. Extraits spécifiques	153
3.1.3. Extraits par polarité croissante de solvants	154
3.2. Détermination de la CMB de l'extrait éthanolique d'écorces sur une souche de <i>E. coli</i>	155
CHAPITRE 3 : DISCUSSION	156
CONCLUSION	161
RÉFÉRENCES	164
RÉSUMÉ	182
ABSTRACT	183
ANNEXES	184

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Données botaniques et ethnopharmacologiques sur 36 espèces végétales utilisées pour leur action antimicrobienne	41
Tableau II : Mise en évidence des composés phytochimiques	60
Tableau III : Résistance de 74 souches de <i>E. coli</i> productrices de bêta-lactamases (63 souches non BLSE et 11 souches BLSE) aux antibiotiques	75
Tableau IVa: Absence d'inhibition de la croissance de la souche de <i>E. coli</i> non BLSE	80
Tableau IVb : Inhibition de 55 à 91% de la croissance de la souche de <i>E. coli</i> non BLSE	81
Tableau IVc : Inhibition de 100% de la croissance de la souche de <i>E. coli</i> non BLSE	82
Tableau V : Inhibition de la croissance d'une souche BLSE de type TEM par les extraits totaux éthanoliques	83
Tableau VI : Activités antibactériennes des extraits éthanoliques de quatre espèces végétales sur trente souches productrices de bêta-lactamases	85
Tableau VII : CMI de <i>Boswellia dalzielii</i> et de <i>Terminalia superba</i> sur trois souches de <i>E. coli</i>	87
Tableau VIII: Rendement des extractions éthanoliques de six espèces végétales inhibitrices de la croissance de la souche BLSE	88
Tableau IX: Principaux composés phytochimiques des 7 extraits inhibiteurs de la croissance de la souche productrice de BLSE	90
Tableau X: Spectres d'absorption du substrat (benzylpénicilline) et de son produit d'hydrolyse (acide pénicilloïque) par la bêta-lactamase	116
Tableau XI : Spectres d'absorption du rouge de phénol avant et après l'hydrolyse de la benzylpénicilline	117
Tableau XII : Valeurs du coefficient d'extinction molaire	119
Tableau XIII : Activité enzymatique des extraits bruts de bêta-lactamase	120

Tableau XIV : Inhibition de la non BLSE par 4 extraits de plante qui n'inhibent pas la croissance de la souche de <i>E. coli</i>	127
Tableau XV: Rendement des extraits totaux (A) et des extraits par polarités croissantes de solvants (B)	149
Tableau XVI : Rendement des extraits spécifiques	150
Tableau XVII : CMI (mg/mL) des extraits éthanoliques des trois organes de <i>Terminalia superba</i>	151
Tableau XVIII : CMI des extraits méthanoliques et aqueux des écorces de <i>Terminalia superba</i>	153
Tableau XIX : CMI (mg/mL) des extraits spécifiques d'écorces de <i>Terminalia superba</i> sur les trois souches de <i>E. coli</i>	154
Tableau XX : Les CMI (mg/mL) des extraits par polarité croissante de solvants sur la souche de <i>E. coli</i> productrice de BLSE	154

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Principaux cycles de type bêta-lactame	10
Figure 2 : Hydrolyse d'une pénicilline par la bêta-lactamase	30
Figure 3 : Hydrolyse d'une céphalosporine par la bêta-lactamase	30
Figure 4 : Détection de la BLSE par la méthode modifiée de Jarlier	74
Figure 5 : L'amplification de l'ADN total des 11 souches productrices de BLSE	76
Figure 6 : Analyse sur gel d'agarose du produit d'amplification de l'ADN total des souches productrices de bêta-lactamases	77
Figure 7 : Migration sur gel d'agarose des produits du génotypage SHV	78
Figure 8 : Activités antibactériennes de 39 extraits totaux éthanoliques sur des souches de <i>E. coli</i>	79
Figure 9 : Inhibition de la souche BLSE de type TEM par l'extrait éthanolique des écorces de <i>Terminalia superba</i>	84
Figure 10 : Hydrolyse de la molécule de benzylpénicilline par la bêta-lactamase et interaction avec le rouge de phénol	110
Figure 11 : Protocole d'étude biochimique des bêta-lactamases extraites de <i>E. coli</i> ; inhibition par les extraits de plante	114
Figure 12 : Spectre d'absorption du rouge de phénol avant et après hydrolyse de la benzylpénicilline	118
Figure 13 : Spectre d'absorption dans l'UV de la benzylpénicilline	121
Figure 14 : Spectres d'absorption dans l'UV de l'azide de sodium et de l'EDTA	121
Figure 15: Profil d'élution de l'activité non BLSE par chromatofocallisation	123
Figure 16 : Profil d'élution de l'activité BLSE par chromatofocallisation	124
Figure 17: Inhibition de l'extrait brut de non BLSE	125
Figure 18 : Inhibition de l'extrait brut de BLSE	126
Figure 19 : Schéma d'une cuve de CCM	137
Figure 20 : Réalisation des extraits aqueux	139

Figure 21: Extraction par polarités croissantes de solvants	134
Figure 22 : Protocole d'extraction spécifique des anthracéniques	135
Figure 23 : Protocole d'extraction spécifique des coumarines	136
Figure 24: Protocole d'extraction spécifique des tanins	137
Figure 25: Détection des composés coumariques dans les extraits éthanoliques des écorces, feuilles et racines	147
Figure 26 : Détection des composés anthracéniques dans les extraits éthanoliques des écorces, feuilles et racines	148
Figure 27 : Détermination de la CMI de l'extrait éthanolique d'écorces	152

LISTE DES PHOTOGRAPHIES

Photographie1 : <i>Terminalia superba</i> (Combretaceae)	46
Photographie 2 : <i>Canarium schweinfurthii</i> (Burceraceae)	47

ABRÉVIATIONS

ADN:	Acide désoxy-ribonucléique
AMC :	Amoxicilline + acide clavulanique
ARN:	Acide ribonucléique
ARNt :	Acide ribonucléique de transfert
ARNm :	Acide ribonucléique messenger
ATCC:	American Type Culture Collection
ATM:	Aztréonam
ATP :	Adénosine triphosphate
BGN:	Bacille à Gram négatif
bla _{SHV} :	Bêta-lactamase sulfudryl variable (gène de bêta-lactamase de type SHV)
bla _{TEM} :	Bêta-lactamase Temoniera (gène de bêta-lactamase de type TEM)
BLSE :	Bêta-lactamase à spectre élargi
°C:	Degré Celsius
CF :	Céfalotine
CIP :	Ciprofloxacine
cm :	Centimètre
CMI :	Concentration minimale inhibitrice
CRO :	Ceftriaxone
CTX :	Céfotaxime
CTX-M:	de Céfotaximase
CZ :	Céfazoline
D :	Doxycycline
dATP:	Deoxy adenosine triphosphate
dCTP:	Deoxy cytosine triphosphate
dGTP	Deoxy Guanosine triphosphate
DHFR :	Dihydrofolate réductase
dTTP:	Deoxy thymidine triphosphate
<i>E. coli</i> :	<i>Escherichia coli</i>
EDTA:	Ethylenediaminetetraacetic acid
EHEC :	entéro-hémorragiques <i>Escherichia coli</i>

EIEC :	entéro-invasives <i>Escherichia coli</i>
EMB:	Eosin Methylene blue
EPEC :	entéro-pathogène <i>Escherichia coli</i>
ETEC :	entéro-toxinogènes <i>Escherichia coli</i>
g :	Gramme
GES:	Guayana extended spectrum beta-lactamase
GM :	Gentamycine
GS :	Gélose de sang
h :	Heure
HCl:	Acide chlorhydrique
IPM :	Imipénème
IR:	Inverted repeat
IS:	Insertion sequence
IRT:	Inhibitor Resistant TEM
Kb	Kilobase
LCR :	Ligase Chain Reaction
µL :	Microlitre
µM :	Micromolaire
µmol :	Micromole
M :	Molaire
mA:	Milliampères
mg :	Milligramme
MgCl ₂ :	Chlorure de Magnésium
min :	Minute
mL :	Millilitre
mM :	Millimolaire
N :	Normal
NA :	Acide nalidixique
NaOH:	Hydroxyde de sodium
NCCLS:	National Comittee for Clinical Laboratory Standards
NET :	Nétilmycine
<i>Nhel</i> :	<i>Neisseria mucosa heidelbergensis</i> I
nm:	Nanomètre

OFX :	Ofloxacine
OXA:	Oxacillinase
Pb:	Paire de base
PBE:	Polybuffer exchanger
PCR :	"Polymerase chain reaction"
PCR-RFLP :	"Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism"
PCR-SSCP :	"Polymerase chain reaction -single strand conformation polymorphism"
PER:	Pseudomonas extended resistance
PGFE :	Pulsed Field Gel Electrophoresis
pH:	Potentiel d'hydrogène
pHi:	Potentiel d'hydrogène isoélectrique
PLP :	Protéines de liaison des pénicillines
<i>Pst</i> I :	<i>Providencia stuartii</i>
RPM :	Rotation par minute
S :	Svedberg
SHV:	Sulfhydryl variable
SXT :	Triméthoprime-sulfamethoxazole
t ARN :	ARN de transfert
Taq:	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TEM :	de Temoniera
TLA:	Tlahuicas (une tribu indienne)
Tn:	Transposons
v :	Volume
VEB:	Vietnam extended spectrum bêta-lactamase

INTRODUCTION

Depuis l'introduction des antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire, le problème de l'augmentation régulière de la résistance des bactéries à ces antibiotiques se pose de façon constante [Brisson-Noël *et al*, 1989 ; Oteo *et al*, 2005]. Plusieurs mécanismes sont mis en jeu par les bactéries pour résister aux antibiotiques. La production d'enzymes inactivatrices constitue le plus important mécanisme de résistance notamment chez les bacilles à Gram négatif (BGN).

Parmi ces enzymes inactivatrices, les bêta-lactamases occupent une place remarquable. Elles hydrolysent la bêta-lactamine responsable de l'activité antibactérienne. La diminution de la stabilité des bêta-lactamines en présence des bêta-lactamases limite donc leur efficacité dans le traitement des maladies infectieuses. L'émergence des souches d'entérobactéries productrices de bêta lactamases à spectre élargi (BLSE) constitue un problème préoccupant. Ces germes, responsables d'infections nosocomiales fréquentes dans les services hospitaliers, sont de plus en plus isolés chez des patients en traitement ambulatoire [Goldstein *et al*, 2000; Daza *et al*, 2001; Hyle *et al*, 2005].

De toutes les familles d'antibiotiques utilisées en infectiologie, les bêta-lactamines ont une grande utilité; à cause de leur toxicité relativement faible, elles sont préconisées pour le traitement des infections chez la femme gestante et chez l'enfant.

Les échecs thérapeutiques dus à l'émergence des germes multi-résistants aux antibiotiques imposent le recours à de nouvelles sources, efficaces, moins onéreuses et plus accessibles à nos populations : les plantes de la pharmacopée pourraient répondre à ces exigences.

Ces dernières années, l'utilisation de l'artémisinine a permis un traitement efficace du paludisme, suite à l'apparition d'une résistance accrue de *Plasmodium falciparum* à la chloroquine prescrite durant de nombreuses années. L'artémisinine a été isolée d'une plante médicinale de la pharmacopée chinoise, *Artemisia annua* (Asteraceae). Cet exemple illustre, de façon marquante, l'utilisation efficace des acquis de la pharmacopée dans la résolution d'un problème de santé publique au niveau international.

La biodiversité végétale africaine constitue un atout majeur dans la recherche de nouveaux traitements des infections causées par les bactéries multi-résistantes aux antibiotiques. La recherche en médecine traditionnelle et en pharmacognosie a permis de répertorier de multiples espèces végétales et leurs vertus thérapeutiques [Adjanohoun *et al*, 1989; Neuwinger *et al*, 2000; Akoegninou *et al*, 2006]. Il est donc nécessaire d'intensifier la recherche sur les espèces végétales à activité antibactérienne. Il s'agit essentiellement :

- d'approfondir les enquêtes ethnobotaniques afin d'identifier ces espèces,
- d'effectuer l'analyse des données afférentes à leur composition chimique,
- d'isoler les principes actifs responsables de cette activité antibactérienne
- et d'entreprendre les essais pharmacologiques, toxicologiques et galéniques.

Une des stratégies de lutte contre le phénomène de résistance des germes pathogènes est l'association d'un inhibiteur de bêta-lactamase à une bêta-lactamine. L'antibiotique augmentin® ou coamox® illustre ce principe : c'est une association de l'antibiotique amoxicilline avec l'acide clavulanique qui est un inhibiteur de bêta-lactamase. La recherche de nouveaux inhibiteurs de bêta-lactamase associés aux bêta-lactamines est aussi une approche efficace de ce problème.

La littérature rapporte l'activité antibactérienne d'extraits végétaux sur des souches cliniques multirésistantes aux antibiotiques usuels; il s'agit de : *Syzygium aromaticum* et *Syzygium cumini* (Myrtaceae) [Nascimento, 2000], *Lawsonia inermis* (Lythraceae), *Punica granatum* (Lythraceae), *Terminalia chebula* (Combretaceae) [Aqil, 2005], *Alstonia boonei* (Apocynaceae) et *Morinda lucida* (Rubiaceae) [Adomi, 2006].

L'objectif de cette étude est d'identifier des espèces végétales de la pharmacopée africaine et de mettre en évidence leurs propriétés

antibactériennes sur des souches de *Escherichia coli* productrices de bêta-lactamases.

Nos objectifs spécifiques sont :

1. effectuer une caractérisation microbiologique et génétique de souches de *Escherichia coli* productrices de bêta-lactamases.
2. réaliser l'étude de l'inhibition de la croissance de ces souches par des extraits de plantes utilisées en médecine traditionnelle dans le traitement de maladies infectieuses.
3. déterminer les caractéristiques biochimiques (activité enzymatique par hydrolyse de la benzylpénicilline et pH isoélectrique) des bêta-lactamases extraites de *Escherichia coli*.
4. évaluer l'inhibition de l'activité des bêta-lactamases extraites de *Escherichia coli* par des extraits de plantes.
5. réaliser l'étude phytochimique de l'espèce végétale qui montre le plus fort taux d'inhibition de la bêta-lactamase.

Le travail que nous avons entrepris est sous-tendu par deux hypothèses :

1. Les plantes de la pharmacopée africaine utilisées dans les affections d'origine infectieuse recèlent de principes actifs antibiotiques qui sont responsables de leurs propriétés antibactériennes. Ces propriétés peuvent s'exercer *in vitro* sur des souches de *Escherichia coli* productrices de bêta-lactamases.
2. L'action antibactérienne décelée chez les extraits de plantes est une activité antibiotique incluant l'inhibition de la bêta-lactamase sécrétée par *Escherichia coli*.

PREMIÈRE PARTIE:

GÉNÉRALITÉS

1. LES ANTIBIOTIQUES ET LA RÉSISTANCE BACTÉRIENNE

Depuis les découvertes de la pénicilline, des sulfamides et de la streptomycine, de très nombreuses substances ayant une activité antibactérienne ont été isolées ou synthétisées, mais seulement un petit nombre a été retenu pour l'usage médical.

Le mode d'action est déterminé par les principaux mécanismes suivants:

- l'inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne
- le blocage de la synthèse des protéines
- le blocage de la synthèse des acides nucléiques
- le métabolisme intermédiaire

Les molécules qui ont une structure chimique de base identique sont regroupées dans une même famille : les bêta-lactamines, les quinolones, les aminosides, les sulfamides et les diaminopyridines, les cyclines, les synergitines, les macrolides, les lincosamides, les phénicol, les nitrofuranes, les polymyxines, les glycopeptides, les nitro-imidazoles.

1.1 Les bêta-lactamines

Les bêta-lactamines constituent la famille la plus riche de molécules à activité antimicrobienne. Elles sont caractérisées par une fonction amine cyclique : le noyau bêta-lactame qui est responsable de l'activité antimicrobienne.

Selon la nature de l'hétérocycle associé au noyau bêta-lactame on distingue : les pénicillines (pénème), les céphalosporines (cephème), les monobactames (azétidine), les carbapénèmes. Le latamoxef possède un cycle oxacéphème alors que les inhibiteurs de la bêta-lactamase sont des dérivés du cycle clavame (Figure 1).

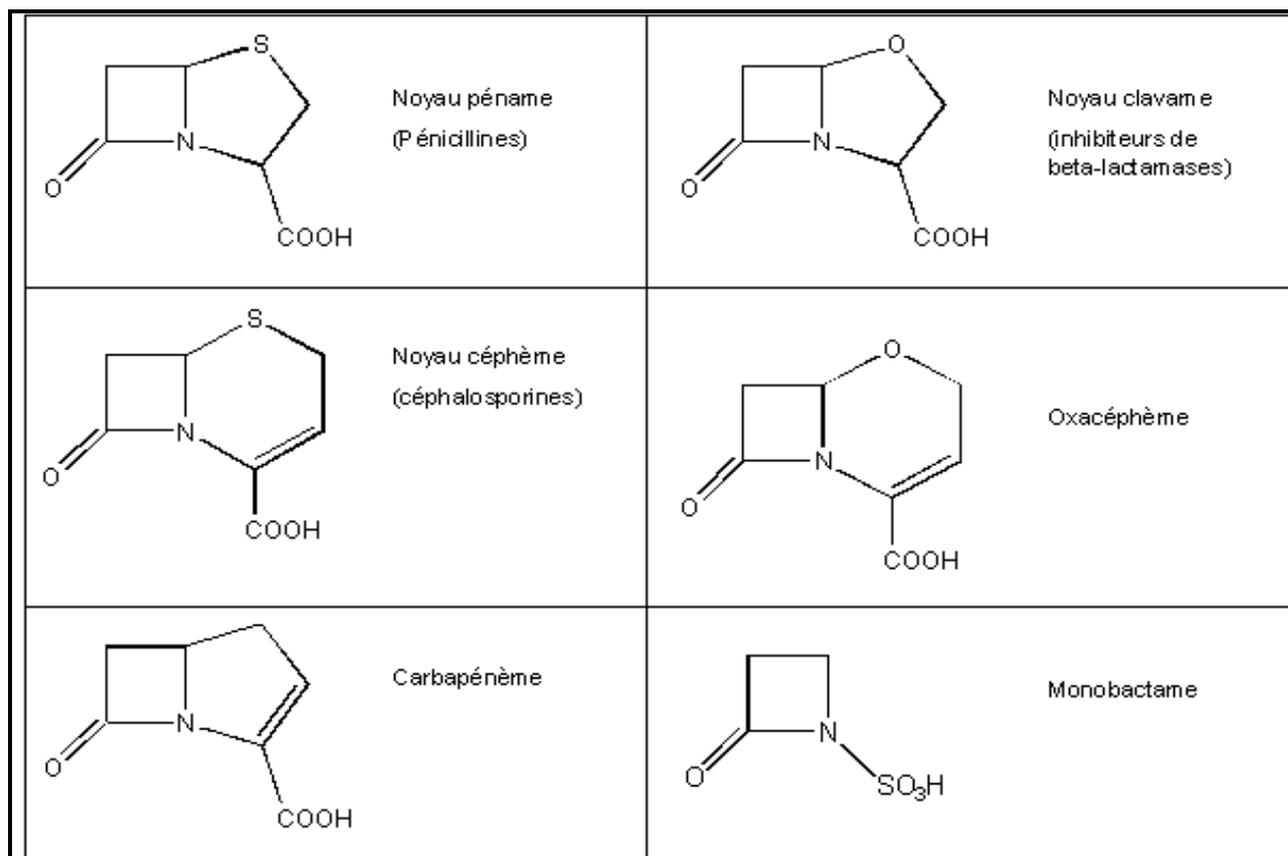


Figure 1: Principaux cycles de type bêta-lactame

1.1.1. Les pénicillines

Le noyau de base est le cycle pénème commun aux représentants de ce sous-groupe. La pénicilline G est la plus ancienne molécule de ce sous-groupe. Les staphylocoques qui étaient très sensibles à la pénicilline G au début de son utilisation, sont de plus en plus résistants: 80 à 90% des souches sont capables d'hydrolyser cette molécule. Certaines bactéries à Gram négatif (*Enterobacteriaceae*, *Pseudomonaceae*) sont naturellement insensibles à l'action de la pénicilline G.

La phénoxy-méthyl-pénicilline, les amino-pénicillines (ampicilline, amoxicilline) et les carboxy-pénicillines appartiennent à cette sous-famille [Singleton, 1994 ; Fauchère *et al*, 2002].

1.1.2. Les céphalosporines

Ce sous-groupe est constitué principalement des céphèmes qui dérivent de la céphalosporine C, molécule naturelle produite par *Cephalosporium acremonium* par modification chimique des chaînes latérales de l'acide 7-aminocéphalosporanique. L'hydrolyse des céphalosporines entraîne l'ouverture du cycle bêta-lactame et la formation de l'acide céphalosporoïque [Berche, 1989].

En fonction du spectre d'activité antibactérienne et de la structure on distingue les céphalosporines de première, deuxième, troisième et quatrième génération. Les céphalosporines de la première génération sont surtout actifs sur les bactéries à Gram positif (à l'exception des entérocoques) et certains bacilles à Gram négatif (*Haemophilus*, *Neisseria*, *Enterobacteriaceae*). Celles de la deuxième génération présentent une meilleure activité sur les souches sensibles de bacilles à Gram négatif.

Les céphalosporines de la troisième et surtout de la quatrième génération sont efficaces aussi bien sur les bactéries à Gram positif (à l'exception des entérocoques) que celles à Gram négatif. Elles sont insensibles à l'action hydrolysante de plusieurs bêta-lactamases. [Berche, 1989 ; Fauchère *et al*, 2002 ; Moulin, 2002].

Cette différence dans le spectre d'activité s'explique par les radicaux de substitution: aminothiazolyl et 7-alpha-methoxy chez les céphalosporines de première et deuxième génération. Celles de la troisième et quatrième génération sont des oxyimino-céphalosporines.

La liste ci-dessous donne quelques exemples de céphalosporines classées par générations:

- Première génération :

Céfaloridine, céfalotine, céfazoline, céfradine, céfalexine.

- Deuxième génération :

Céfamandole, cefoxitine , céfuroxime, céfaclor, céforadine, céfotétan.

- Troisième génération :

Ceftriaxone, céfopérazone, latamoxef, ceftazidime, céfotaxime.

- Quatrième génération :

Cefépime, cefpirome.

1.1.3. Les carbapénèmes et les monobactames

Les carbapénèmes (imipénème et meropénème) ont des concentrations minimales inhibitrices (CMI) très basses vis-à-vis de la plupart des bactéries à Gram positif et négatif, y compris la quasi-totalité des souches productrices de bêta-lactamases à spectre élargi (BLSE).

L'activité de l'aztréonam, un monobactame, est comparable à celle des céphalosporines de troisième génération [Fauchère, *et al* 2002].

1.1.4. Mode d'action des bêta lactamines et résistance bactérienne aux bêta-lactamines

Les bêta-lactamines sont des antibiotiques bactéricides qui inhibent la synthèse de la paroi bactérienne chez les bactéries en voie de multiplication. Les bêta-lactamines sont fixées de manière covalente sur les transpeptidases et les transcarboxypeptidases (enzymes associées à la membrane cytoplasmique) à cause de leur analogie structurale avec le substrat naturel l'acyl-D-alanyl-D-alanine. La conséquence de cette fixation est le blocage de toute activité de ces enzymes.

Chez les bactéries à Gram positif les bêta-lactamines atteignent facilement leurs cibles car leur diffusion à travers les peptidoglycanes se fait de manière passive. Chez les bactéries à Gram négatif par contre, elles doivent d'abord franchir la membrane externe hydrophobe en se liant à des protéines dénommées PLP (protéines de liaison des pénicillines) [Berche, 1989 ; Flandrois, 1997].

Parmi les mécanismes impliqués dans la résistance bactérienne aux bêta-lactamines, la production d'enzymes inactivatrices est le plus

important notamment chez les bacilles à Gram négatif. De ces enzymes inactivatrices, les bêta-lactamases qui entraînent la perte de l'activité antibactérienne de la bêta-lactamine occupent une place remarquable. La modification des protéines de liaison aux pénicillines (PLP) est la deuxième cause de la résistance aux bêta-lactamines tandis que l'imperméabilité de la paroi est moins fréquente chez les bactéries à Gram négatif (BGN) [Fluit *et al* 2001; Poole *et al*, 2004].

Remarque

Il existe une classe de substances pharmacologiques apparentées aux bêta-lactamines : les inhibiteurs de bêta-lactamases. Ces molécules, dépourvues d'une activité antibiotique, possèdent un noyau clavame qui contient également le cycle de base bêta-lactame qui caractérise les bêta-lactamines. L'inhibiteur bloque l'activité de la bêta-lactamase et les bêta-lactamines peuvent alors exercer leur action sur la membrane bactérienne. Les inhibiteurs de bêta-lactamases les plus spécifiques connus et utilisés en clinique sont l'acide clavulanique, le sulbactame et le tazobactame. Après leur liaison irréversible au niveau du site actif de la bêta-lactamase, il se forme un complexe stable. La combinaison d'un inhibiteur de bêta-lactamases avec une bêta-lactamine (amoxicilline+acide clavulanique, pipéracilline+tazobactame) est une solution à la résistance aux bêta-lactamines.

L'acide clavulanique est une substance naturelle produite par *Streptomyces clavuligerus* alors que le sulbactame et le tazobactame sont des molécules semi-synthétiques [Reading *et al*, 1977 ; Robert-Demuet, 1995 ; Fauchère *et al* 2002].

1.2. Les aminosides

Les premiers représentants de ce groupe sont des molécules naturelles produites par des souches de *Streptomyces* (streptomycine, néomycine, kanamycine, tobramycine) ou d'*Actinomyces* (gentamicine, sisomicine). Ces

produits ont servi de base pour la synthèse d'antibiotiques semi-synthétiques tels que l'amikacine et la nétylmicine qui sont efficaces sur les bactéries devenues résistantes aux aminosides naturels.

Les aminosides pénètrent dans le cytoplasme bactérien par un mécanisme de transport nécessitant l'ATP et le système de transport d'électrons. Ce sont des inhibiteurs de la traduction car en se fixant de manière irréversible à la sous-unité 30S du ribosome bactérien, ils induisent une déstabilisation du complexe codon-anticodon. Il se produit des erreurs dans la lecture de l'ARN messager et les protéines synthétisées sont anormales et non fonctionnelles [Flandrois, 1997; Fauchère *et al*, 2002].

La plupart des gènes de résistance à cette famille d'antibiotiques se retrouve chez les bactéries à Gram négatif. La production d'enzymes modifiant le groupe amine (aminosides acetyltransférases) ou le groupe hydroxyl des aminosides (aminosides adenilyl-transférases et aminosides phosphotransférases) entraîne la perte de leur capacité de liaison au ribosome et donc l'inactivation de ces antibiotiques. [Fluit *et al*, 2001].

1.3. Les quinolones

Les quinolones ont en commun le cycle quinoléine. L'acide nalidixique est le plus ancien représentant de ce groupe. Les fluoroquinolones (norfloxacine, ciprofloxacine, ofloxacine, péfloxacine) ont un spectre plus étendu [Flandrois, 1997].

Les quinolones agissent au niveau de la synthèse de l'ADN en inhibant deux enzymes essentielles à sa conformation:

- la topoisomérase IV qui intervient dans la séparation des brins d'ADN après leur synthèse pendant la division cellulaire
- et la gyrase qui assure l'enroulement de l'ADN en super-hélice à l'intérieur de la cellule bactérienne.

Les quinolones se fixent sur l'ADN gyrase et la topoisomérase IV dans une région proche du site de liaison de ces enzymes avec les groupes phosphates de la chaîne d'ADN. Il en résulte une inhibition de l'activité de

ces enzymes qui a pour conséquence l'arrêt de plusieurs processus métaboliques aboutissant à la mort de la cellule.

Le principal mécanisme de résistance aux quinolones est la synthèse par la bactérie d'enzymes cibles modifiées par mutation de leurs gènes. Ainsi chez *Escherichia coli* la résistance aux quinolones est due à la production d'une ADN gyrase modifiée au niveau de la sous-unité qui entre en interaction avec les groupes phosphates de la chaîne d'ADN.

Les deux enzymes cibles étant localisées dans le cytoplasme de la cellule bactérienne, les quinolones doivent traverser la membrane bactérienne. Ainsi chez les bactéries à Gram négatif, la résistance aux quinolones est souvent associée à des modifications de la paroi notamment de la membrane externe [Drlica *et al* 1997 ; Fauchère *et al* 2002].

1.4. Les cyclines

Les cyclines dont les premières molécules ont été isolées de *Streptomyces* sont aujourd'hui produites par hémisynthèse. La minocycline et la doxycycline sont les cyclines les plus utilisées. Elles se fixent sur le ribosome au niveau du site aminoacyl et perturbent l'interaction avec les ARNt. L'élongation de la chaîne polypeptidique est arrêtée ainsi que le mouvement des ribosomes le long de l'ARNm.

La résistance à cette classe d'antibiotiques est due à la production de protéines qui entrent également en interaction avec le ribosome afin de le protéger contre l'action des cyclines. La résistance aux cyclines est aussi provoquée par leur faible concentration cellulaire suite à leur excrétion rapide de la cellule bactérienne [Fluit *et al*, 2001 ; Fauchère *et al*, 2002].

1.5. Les sulfamides et les diaminopyridines

Les sulfamides sont des dérivés de l'acide aminoparabenzoiïque. Ils inhibent la synthèse de l'acide tétrahydrofolique (cofacteur dans la synthèse des bases puriques et pyrimidiques) de manière sélective chez les bactéries.

Les eucaryotes assimilent ce composé contenu dans les aliments. Les

sulfamides inhibent la dihydropteroate synthétase alors que les diaminopyridines (triméthoprime) bloquent la dihydrofolate réductase [Singleton, 1994 ; Neal, 2003].

La résistance au triméthoprime est provoquée par trois mécanismes :

- la surproduction de l'enzyme dihydrofolate réductase (DHFR) qui neutralise l'action des antibiotiques
- la mutation du gène chromosomique de la DHFR
- l'acquisition d'un plasmide portant un gène modifié de la DHFR

Les deux derniers mécanismes de résistance entraînent la synthèse d'une enzyme modifiée incapable d'interaction avec l'antibiotique [Fluit *et al*, 2001].

1.6. Autres antibiotiques

Les synergitines, les macrolides et les lincosamides agissent en se liant à la sous-unité 50S des ribosomes.

Les synergitines A provoquent un changement de la conformation du ribosome. La fixation des aminoacyl-ARNt n'est plus possible et l'élongation de la chaîne peptidique est arrêtée. Les synergitines de type B, les macrolides et les lincosamides inhibent la formation de la liaison polypeptidique en bloquant la translocation. Il en résulte le détachement de la chaîne d'acides aminés du ribosome.

Les macrolides doivent leur nom à leur structure chimique composée d'un macrocycle lactonique de 14, 15 ou 16 atomes sur lequel se fixent un ou deux sucres dont l'un est aminé. Les macrolides les plus utilisés sont : l'érythromycine, la rovamycine et la spiramycine [Flandrois , 1997 ; Fauchère *et al*, 2002].

Les phénicols interagissent avec la sous-unité 50S du ribosome bactérien pour inhiber la synthèse protéique (chloramphénicol, thiamphénicol). Ils se fixent sur le site aminoacyl et empêchent l'interaction du ribosome avec les ARNt. L'élongation de la chaîne peptidique est arrêtée ainsi que le mouvement des ribosomes le long de l'ARN messager. Ils ont été

très utiles dans le traitement de la typhoïde. [Flandrois , 1997 ; Fauchère *et al*, 2002]

Les nitrofuranes telle la nitroxoline inhibent des enzymes intervenant dans la dégradation du glucose et des pyruvates.

Les polymyxines sont des peptides actifs contre beaucoup de bacilles à Gram négatif (colistine, polymyxine B). Ils se fixent sur les phospholipides de la membrane externe. Celle-ci devient perméable et est endommagée [Singleton, 1994 ; Flandrois , 1997].

Les glycopeptides, comme les bêta-lactamines agissent sur la synthèse de la paroi bactérienne. Ils forment des complexes avec les résidus peptidyl-D-ala-D-ala nécessaires à la synthèse du peptidoglycane (vancomycine et teicoplanine). La vancomycine et la teicoplanine agissent surtout sur les bactéries à Gram positif. Leur action étant très lente, on doit les associer à d'autres antibiotiques [Berche, 1989 ; Flandrois , 1997].

Les nitro-imidazoles, connus pour leur action anti-protozoaire et anti-amibienne (exemple : métronidazole), ils sont également actifs sur les bactéries anaérobies. Leur mécanisme d'action est dû à la présence d'un groupe NO₂ sur le noyau imidazole. Ce groupe est transformé après pénétration de la cellule par une nitroréductase bactérienne. Les composés qui en résultent sont des radicaux libres qui endommagent l'ADN ou des dérivés cytotoxiques [Neal, 2003].

1.7. Bases génétiques de la résistance bactérienne aux antibiotiques

La résistance bactérienne peut être provoquée par plusieurs mécanismes : la présence d'enzymes inactivatrices de l'antibiotique, une mutation du récepteur de l'antibiotique qui va diminuer sa capacité de liaison, des modifications posttranscriptionnelles ou posttraductionnelles

qui réduisent l'affinité de la molécule antimicrobienne pour sa cible ou une surproduction de la cible de l'antibiotique [Fluit *et al*, 2001].

1.7.1. La résistance naturelle

La résistance naturelle est observée chez toutes les souches d'une même espèce. Elle est due à l'inaccessibilité de la cible pour l'antibiotique, la faible affinité de la cible pour l'antibiotique, l'absence de cible chez l'espèce résistante ou la production d'enzymes inactivatrices. La résistance naturelle des staphylocoques à l'acide pipémidique et à l'acide nalidixique est due à une très faible affinité de ces quinolones pour leur ADN gyrase. Les souches sauvages de *Pseudomonas* et d'*Acinetobacter* produisent des bêta-lactamases qui sont à l'origine de leur résistance naturelle aux pénicillines.

1.7.2. La résistance acquise

La résistance acquise apparaît chez quelques souches d'une espèce normalement sensible à l'action d'un antibiotique. La résistance acquise est provoquée par une mutation affectant un gène régulateur ou un gène de structure ou alors par acquisition d'un gène de résistance.

Les mutations

Les mutations apparaissent spontanément dans le chromosome avec des fréquences de 10^{-6} à 10^{-9} selon les bactéries et les caractères considérés. L'antibiotique n'est pas directement mutagène mais sa présence sélectionne les rares mutants résistants qui apparaissent spontanément au sein d'une population sensible. Ce type de résistance concerne 10 à 20% des souches isolées en clinique et est observé surtout après l'utilisation de certains antibiotiques.

Les changements peuvent affecter des structures cellulaires comme les porines, protéines qui permettent le passage transpariétal des antibiotiques entraînant une imperméabilité de la cellule bactérienne. Ces changements interviennent également au niveau intracellulaire où ils peuvent affecter

l'ARN polymérase ou l'ADN gyrase.

Une mutation est à l'origine de l'hyperproduction de la bêta-lactamase naturellement présente dans le chromosome de *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia* et *Pseudomonas*. Des mutations affectant les gènes des bactéries à gram négatif (BGN) entraînent l'activation de pompes à efflux qui expulsent le chloramphénicol, les quinolones et la tétracycline hors de la bactérie.

Acquisition de gènes de résistance

- Les gènes de résistance provoquent l'inactivation de l'antibiotique par la perte de son affinité pour la cible. L'inactivation peut être intra ou extracellulaire. Ainsi les bêta-lactamines sont inactivées par les bêta-lactamases excrétées dans l'espace périplasmique chez les bactéries à Gram négatif ou dans le milieu de culture dans le cas des bactéries à Gram positif. Des enzymes intracellulaires sont à l'origine de l'inactivation du chloramphénicol et des aminosides dans le cytoplasme de la bactérie.

- Les gènes de résistance sont à l'origine de la modification de la cible de l'antibiotique, ce qui entraîne la perte de l'affinité. C'est le cas de la résistance aux macrolides où l'ARN 23S après modification par une méthylase, perd son affinité pour l'antibiotique.

- On observe également à travers un système d'isoenzymes la substitution de la cible par un composé insensible à l'action de l'antibiotique. Ainsi lors de la résistance au triméthoprim, le gène de résistance code pour la synthèse d'isoenzymes de la dihydroptéroate qui sont insensibles à l'action de l'antibiotique.

1.7.3. Propagation de la résistance aux antibiotiques

Les gènes de résistance aux antibiotiques sont portés par des plasmides, des transposons, des intégrons ou des phages. La dissémination se fait par conjugaison (plasmides, transposons), par transduction ou par transformation.

La transformation par l'ADN exogène nu est peu répandue et a été décrite chez *Acinetobacter*, *Campylobacter*, *Haemophilus* et *Neisseria*. La

transduction se fait par des phages ou des virus. Ce phénomène affecte en général des bactéries de la même espèce. La conjugaison a été décrite chez la quasi-totalité des espèces bactériennes et permet la circulation horizontale de l'information génétique.

Les plasmides

Le plasmide est de l'ADN généralement circulaire, souvent trouvé dans les bactéries et d'autres types de cellules [Brown, 2002].

Les plasmides conjugatifs sont autotransférables d'une bactérie à une autre. Leur taille est généralement supérieure à 30 kb. Chez *Escherichia coli* ils peuvent atteindre 90 kb. Le nombre de copies par cellule est faible (1 à 3). Leur transfert survient de manière intraspécifique, au sein du même genre, mais aussi de manière interspécifique entre des bactéries phylogénétiquement très éloignées.

Les plasmides non conjugatifs sont de petite taille (1 à 70 kb) et en grand nombre de copies dans la cellule bactérienne. Leur transfert se fait par transduction.

Les transposons

Les transposons sont des éléments génétiques qui peuvent se déplacer d'un endroit à un autre dans une molécule d'ADN [Brown, 2002].

Sur le génome des transposons composites, on retrouve des gènes de résistance aux antibiotiques, des gènes de virulence et des gènes métaboliques. Ces gènes sont flanqués de séquences d'insertion IS qui se trouvent associées aux fragments de DNA codant pour les différents caractères. Les transposons Tn5, Tn9 et Tn10 retrouvés chez les bactéries à Gram négatif appartiennent à cette catégorie d'éléments génétiques mobiles.

Les transposons de la famille Tn3 sont constitués de deux séquences IR encadrant un gène TnpA qui contient entre autres un gène bla de résistance aux bêta-lactamines. Chez les bactéries à Gram positif on retrouve Tn 551, Tn 917 qui sont des représentants de cette même famille.

Les transposons conjugatifs portent divers gènes dont certains codent pour la résistance à la tétracycline. Ils ont été détectés et décrits chez les bactéries à Gram positif, mais leur spectre d'hôte est très large incluant des bactéries à Gram négatif comme *Escherichia coli* et *Pseudomonas*.

Les intégrons

Ce sont des groupes de gènes et d'autres séquences d'ADN qui permettent aux plasmides de capturer les gènes d'autres plasmides [Brown, 2002].

Les intégrons sont constitués sous forme de cassettes et sont obligatoirement portés par un chromosome ou un plasmide car incapables d'autoréplication. Les gènes portés par ces éléments génétiques mobiles peuvent se disséminer par un système d'insertion-excision. On trouve ainsi des gènes de résistance aux bêta-lactamines, aux aminosides, au triméthoprim, au chloramphénicol transportés par des intégrons. [Gaudy, 2005; Euzéby, 2006].

2. LES ENZYMES DE RÉSISTANCE AUX BÊTA-LACTAMINES : LES BÊTA-LACTAMASES

Les bêta-lactamases (EC 3.5.2.6.) appartiennent à la grande famille des hydrolases d'amides cycliques. Elles sont synthétisées dans le cytoplasme sous forme de protéines immatures qui, grâce au signal peptide présent à leur extrémité N-terminal sont transportées dans le périplasme. Après le clivage de cette séquence elles peuvent exercer leur activité enzymatique [Knowles , 1985 ; Bush *et al*, 1995].

Les bêta-lactamases se retrouvent chez les bactéries à Gram positif et celles qui sont Gram négatif. Leurs gènes sont localisés aussi bien sur les plasmides que dans le chromosome bactérien.

2.1. Classifications des bêta-lactamases

La classification de Ambler [1980] basée sur l'homologie de séquence de la chaîne d'acides aminés des bêta-lactamases distingue quatre classes: A, B, C et D. La classe A regroupe les enzymes qui hydrolysent les pénicillines et les céphalosporines. Leurs gènes se retrouvent sur des plasmides ou des transposons. Leur poids moléculaire est d'environ 30 000 daltons. Les BLSE appartiennent au sous-groupe 2be de cette classe. Les enzymes de type VEB, CTX-M et PER font également partie de la classe A.

Les enzymes de la classe B, actives vis-à-vis des pénicillines et des céphalosporines ont un poids moléculaire de 23 000 daltons; certaines d'entre elles sont capables de dégrader les carbapénèmes. Ces enzymes sont dénommées métallobêta-lactamases à cause présence d'ions de zinc au niveau de leur site actif.

La classe C regroupe les bêta-lactamases inductibles qui, par la suite de mutations peuvent devenir dérprimées produisant une synthèse de l'enzyme dite de haut niveau. Leurs gènes se trouvent généralement sur le chromosome bactérien. Les oxacillinases appartiennent à la classe D.

Les bêta-lactamases de classes A, C et D sont caractérisées par la présence d'un résidu sérine au niveau du site actif [Bonomo R. *et al*, 1999 ; Fluit *et al*, 2001 ; Bonnet, 2004].

Plusieurs autres procédés de classification des bêta-lactamases ont été proposés. L'activité enzymatique et la spécificité vis-à-vis des substrats sont à la base de la classification proposée par Richmond [1973].

Matthew s'est servi des données sur les points isoélectriques pour classer les différentes bêta-lactamases [Matthew *et al*, 1975]. La distinction en pénicillinases (hydrolysant les pénicillines) et en céphalosporinases (hydrolysant les céphalosporines) a été également utilisée à une époque où les données de la biologie moléculaire permettant l'établissement de l'homologie de séquences entre les gènes des bêta-lactamases étaient peu abondantes. Bush *et al* [1995] ont établi une classification basée sur la structure moléculaire, la séquence nucléotidique du gène et les propriétés

biochimiques. Les séquences des différentes bêta-lactamases détectées chez les *Enterobactériaceae* sont répertoriées sur le site <http://www.lahey.org/studies/webt.htm>.

La nomenclature des différentes familles de bêta-lactamases n'a pas été réalisée sur une base rationnelle. La dénomination TEM provient de Temoniera, le nom de la patiente chez laquelle la première enzyme de ce type (TEM1) a été isolée. SHV provient de l'abréviation de "sulfudryl variable" qui se rapporte à une propriété biochimique attribuée aux premiers représentants de ce groupe. Les désignations CTX-M et OXA, sont relatifs à l'hydrolyse préférentielle respectivement de la céfotaxime et de l'oxacilline par ces types d'enzymes. La première enzyme de type PER a été isolée chez *Pseudomonas aeruginosa* d'où la dénomination *Pseudomonas* extended resistance. Vietnam extended spectrum bêta-lactamase (VEB) a été attribué à une famille de BLSE dont le premier représentant a été isolé au Vietnam.

2.1.1. Définition et origine des BLSE

Les BLSE sont des bêta-lactamases capables d'hydrolyser les oxyimino céphalosporines et l'aztréonam. Elles sont généralement sensibles à l'action des inhibiteurs notamment de l'acide clavulanique. [Bradford, 2001 ; Morris *et al* , 2003].

Au début des années 1980 les céphalosporines à large spectre ont été introduites sur le marché après l'apparition des bêta-lactamases hydrolysant les pénicillines semi-synthétiques et les céphalosporines de la première et deuxième générations.

Dès 1983, il est décrit à Francfort en Allemagne, la première bêta-lactamase à spectre élargi SHV-2 qui dérive de SHV-1, dont l'activité était limitée aux bêta-lactamines de première et deuxième générations. SHV-2 se retrouve dans des souches de *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella ozaenae* et de *Serratia marcescens* [Knothe *et al*, 1983]. En 1987, la première BLSE est décrite chez une souche de *E. coli* [Bauernfeind *et al*, 1987].

Très vite après l'apparition de SHV-2, les BLSE ont été mises en évidence dans d'autres parties du monde. Elles appartiennent le plus souvent aux familles TEM et SHV et dérivent de TEM-1, TEM-2 et SHV-1 par substitutions de quelques acides aminés. Ces substitutions leur permettent d'entrer en interaction avec plusieurs antibiotiques de la classe des bêta-lactamines dont les oxyimino-céphalosporines [Heritage *et al*, 1999].

2.1.2. Les non-BLSE

Les non-BLSE regroupent les bêta-lactamases qui hydrolysent les pénicillines ainsi que les céphalosporines de première et deuxième générations. Diverses bêta-lactamases d'origine chromosomique qui hydrolysent les céphalosporines de première génération sont des non-BLSE. Elles peuvent être inductibles (leur synthèse a lieu en présence du substrat) ou dérèprimées.

SHV-1, TEM-1, TEM-2 ainsi que la plupart des enzymes de type OXA appartiennent à ce groupe. SHV1 se retrouve principalement chez *Klebsiella* où son gène est localisé sur le chromosome bactérien. Cette bêta-lactamase est présente avec une plus faible fréquence chez les autres entérobactéries dont *E. coli* où le gène bla_{SHV1} est porté par des plasmides.

La résistance à l'ampicilline chez les enterobactéries est due principalement à la présence de TEM-1 dont le gène est codé par un plasmide. TEM-2 est une bêta-lactamase proche de TEM-1 mais moins répandue [Heritage *et al*, 1999 ; Paterson *et al*, 2005].

2.2. Les différents types de BLSE

2.2.1. Le type TEM

TEM vient de Temoniera, le nom de la patiente grecque chez qui la première bêta-lactamase a été isolée en 1965 [Datta *et al*, 1965].

Cette famille regroupe les bêta-lactamases qui hydrolysent les pénicillines, les céphalosporines de première génération ainsi que leurs

dérivés qui montrent une activité BLSE. Les substitutions d'acides aminés à des positions bien données confèrent à ces dérivés la capacité d'hydrolyser les oxyimino-céphalosporines, associée souvent à un changement du pH isoélectrique.

Pour développer le phénotype de BLSE, les mutations doivent survenir à des positions données qui concernent des acides aminés précis : à la position 104 ou 240 la glutamine est remplacée par la lysine ; l'arginine est remplacée par la sérine ou l'histidine à la position 164 ; à la position 238 on retrouve la sérine au lieu de la glycine [Bradford, P.A. 2001].

Les bêta-lactamases de type TEM sont rencontrées fréquemment chez *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* mais leur présence est également signalée chez d'autres *Enterobacteriaceae* ainsi que d'autres bactéries à Gram négatif [Morosini *et al*, 1995 ; Pitout *et al*, 1998 ; Perilli *et al*, 2000].

2.2.2. Le type SHV

La désignation de ce type de bêta-lactamase provient d'une propriété biochimique, "sulfhydryl variable" [Paterson *et al*, 2005]. La plus ancienne bêta-lactamase décrite dans cette famille, SHV-1 est retrouvée fréquemment dans des isolats de *Klebsiella pneumoniae* où son gène est porté par un plasmide. Chez plusieurs souches de *Klebsiella pneumoniae*, le gène *bla*_{SHV-1} peut être intégré dans le chromosome bactérien [Livermore, 1995].

Les substitutions d'acides aminés caractérisant les différentes enzymes de ce type affectent principalement la position 238 où la sérine remplace la glycine [Bradford 2001].

On observe également la substitution de l'acide aspartique à la position 179 par l'asparagine ou par l'alanine. Cette substitution a pour conséquence l'élargissement de la cavité dans laquelle la bêta-lactamine s'insère. De ce fait, les céphalosporines à large spectre peuvent accéder au site actif de l'enzyme par leur partie methoxyamine favorisant une liaison très forte de la céfotaxime et de la ceftazidime pendant la réaction d'hydrolyse. Ceci réduit l'efficacité d'hydrolyse de ces enzymes qui

compensent ce désavantage par des mutations dans la région du promoteur provoquant une synthèse accrue de la bêta-lactamase [Heritage *et al*, 1999].

Les bêta-lactamases de type SHV se retrouvent également chez d'autres *Enterobactériaceae* tels que *Escherichia coli*, *Citrobacter diversus*, *Morganella morgani*. Leur présence a été signalée dans des souches de *Pseudomonas aeruginosa* [Naas *et al*, 1999 ; Heritage *et al*, 1999].

2.2.3. Le groupe CTX-M

Ce groupe de BLSE hydrolyse de préférence la céfotaxime. On le retrouve principalement dans des souches de *Salmonella enterica* serovar typhus ainsi que chez *E. coli* et d'autres espèces de la famille des *Enterobacteriaceae*.

Les enzymes de type CTX-M ont une homologie de 40% ou moins avec les BLSE de type TEM et SHV [Paterson, 2005]. Elles s'apparentent beaucoup plus aux bêta-lactamases de classe A codées par le chromosome bactérien dans les souches de *Klebsiella oxytoca*, *Proteus vulgaris* ou *Serratia fonticola* [Bonnet, 2004 ; Bradford, 2001].

La présence chez les céfotaximases d'un résidu sérine à la position 237 joue probablement un rôle important dans leur activité hydrolytique [Bonnet, 2004].

Les céfotaximases ont été signalées dans plusieurs parties du monde. Ces dernières années, elles connaissent une dissémination rapide en Inde et en Chine où elles sont signalées fréquemment. Leur apparition dans différentes régions du monde n'est probablement le résultat d'une évolution parallèle. La présence de CTX-M-3 en Pologne et à Taiwan renforce l'hypothèse de l'évolution indépendante de cette famille d'enzymes de part le monde.

Elles se retrouvent souvent dans les isolats d'agents pathogènes responsables de diarrhées acquises en milieu non-hospitalier. Elles sont plus susceptibles à l'inhibition par le tazobactame que par l'acide clavulanique et le sulbactame [Paterson *et al*, 2005].

2.2.5. Le groupe OXA

Ces enzymes appartiennent à la classe D et au groupe fonctionnel 2d selon la classification de Bush [Bush *et al*, 1995] Elles sont très peu inhibées par l'acide clavulanique et exercent une grande activité hydrolytique contre l'oxacilline et la cloxacilline. Leur nom provient de leur aptitude d'hydrolyse vis-à-vis de l'oxacilline.

La majorité des bêta-lactamases de type OXA n'hydrolysent pas les céphalosporines à spectre étendu et ne sont donc pas des BLSE. Certains représentants de cette famille tels que OXA-11, -14, -15, -16, -17, -18, -19, -28, -31, -32, -35, et -45 confèrent la résistance à la céfotaxime et dans une moindre mesure à la ceftazidime et à l'aztréonam [Paterson *et al*, 2005]. Le caractère BLSE est dû à des substitutions d'acides aminés par rapport à la séquence de OXA-10, l'enzyme de laquelle dérive la plupart des BLSE de cette famille. L'homologie de séquence entre les membres de cette famille ne dépasse pas 20% [Bradford P. A., 2001]. Ce type d'enzymes se retrouve principalement chez *Pseudomonas aeruginosa* mais sa présence est signalée chez d'autres BGN dont *E. coli* [Bradford, 2001 ; Paterson *et al*, 2005].

2.2.5. Les bêta-lactamases de type IRT

Leur dénomination provient de "Inhibitor Resistant TEM" car les premières enzymes de ce type sont de la famille TEM. Ce sous-groupe de bêta-lactamases dérive des BLSE de types SHV et TEM.

Leur particularité est la résistance à l'inhibition de l'acide clavulanique et du sulbactame. Les souches bactériennes possédant ces enzymes répondent au traitement par la combinaison piperacilline + tazobactame [Bush *et al*, 1995 ; Bradford, 2001].

2.2.6. Autres BLSE

D'autres familles de BLSE de moindre importance ont été décrites dans diverses parties du monde. Il existe d'autres céfotaximases appartenant aux

familles VEB, PER, TLA, GES dont le gène a une localisation plasmidique. L'homologie de séquence est de 40 à 50% entre ces différentes familles.

La première enzyme de la famille VEB a été isolée d'une souche de *E. coli* chez un patient vietnamien. Plus tard elle est signalée chez d'autres bactéries à Gram négatif. Une enzyme de type PER a été signalée pour la première fois en Turquie [Bradford, 2001].

2.3. Méthodes de détection des bêta-lactamases

2.3.1. Méthodes microbiologiques

Les bêta-lactamases à spectre étendu étant caractérisées par leur capacité à hydrolyser les oxyimino-céphalosporines et l'aztréonam, la première étape de leur détection consiste à tester la résistance de la souche à analyser vis-à-vis de ces antibiotiques. Selon les recommandations de l'office américain NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) datant de 2003, l'emploi de plusieurs antibiotiques augmente la sensibilité du test. Le test peut être réalisé sur gélose à l'aide de disques d'antibiotiques ou en milieu liquide avec incorporation des poudres d'antibiotiques au bouillon de culture (Yu *et al*, 2002 ; Tenover *et al*, 2003 ; Linscott *et al*, 2005).

La seconde étape qui sert à confirmer la présence de BLSE est basée sur l'action inhibitrice de l'acide clavulanique. Elle peut se faire sur gélose :

- la méthode de Jarlier *et al* [1988] consiste à placer au centre de la boîte de pétri un disque d'amoxicilline+acide clavulanique et à disposer à 2 cm de ce dernier un ou plusieurs disques de céphalosporines de troisième et quatrième génération (ceftriaxone, ceftazidime, céfotaxime, céfépime et cefpirone) ainsi que de l'aztréonam (un monobactame). La synergie avec l'acide clavulanique entraîne un double halo d'inhibition. Cette méthode assez facile a été utilisée par

plusieurs chercheurs [Pitout *et al*, 1998 ; Fang *et al*, 2004 ; Gangoué-Pieboji *et al*, 2005 ; Bert *et al*, 2005).

- Dans un test similaire développé par Jacoby *et al* [1996], on ajoute du sulbactame (20 µg) à un disque de céphalosporine de troisième et quatrième génération. Une augmentation de 5mm de la zone d'inhibition du disque contenant l'inhibiteur et l'antibiotique par rapport au diamètre d'inhibition de l'antibiotique seul permet de conclure à la présence de BLSE. On peut également utiliser l'acide clavulanique à la place du sulbactame [Watt *et al*, 2000].
- l'usage de bandelettes imprégnées d'un gradient de ceftazidime dans une moitié et de ceftazidime+ acide clavulanique dans l'autre moitié est proposé par AB Biodisk, Solna. On conclut à la présence de BLSE lorsque la CMI est réduite d'au moins 1\8 en présence de l'acide clavulanique [Bradford, 2001].
- En milieu gélosé, l'office américain NCCLS recommande l'utilisation de la céfotaxime et de la ceftazidime avec et sans acide clavulanique. Une augmentation de 5 mm du diamètre d'inhibition en présence de l'acide clavulanique indique la production de BLSE [NCCLS, 1999].

L'étape de confirmation de la présence de BLSE peut également se faire en milieu liquide.

- Les recommandations du NCCLS préconisent la détermination des CMI de la céfotaxime et de la ceftazidime seules et en présence de l'acide clavulanique. La diminution de la CMI d'un facteur supérieur ou égal à 8 en présence de l'acide clavulanique permet de conclure à la production de BLSE [NCCLS 2002].

- La méthode automatisée de Vitek (Biomérieux, Hazelwood) est basée sur la réduction de la croissance bactérienne dans des puits contenant la ceftazidime ou la céfotaxime en combinaison avec l'acide clavulanique comparée à la croissance en présence de l'antibiotique seul [Bradford, 2001].

2.3.2. Méthodes biochimiques

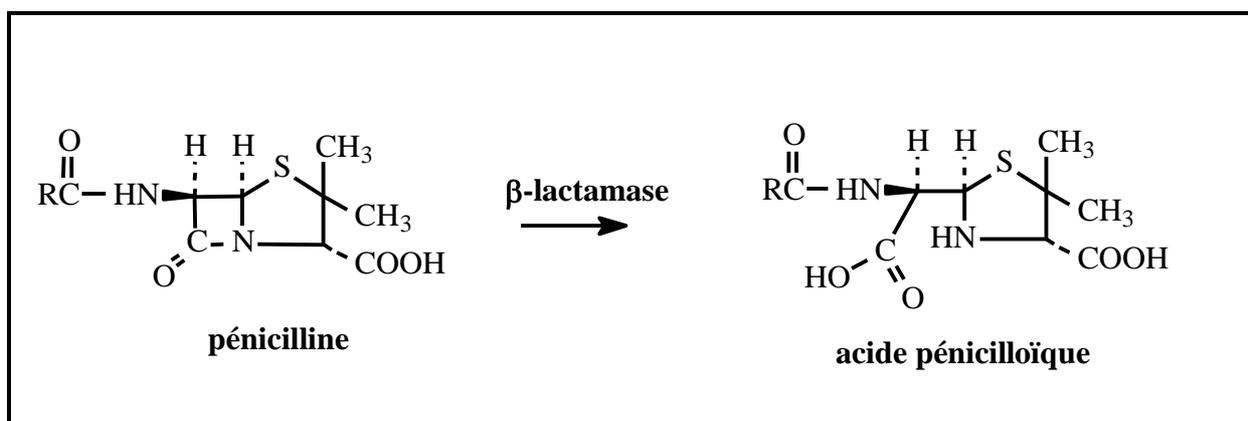


Figure 2 : Hydrolyse d'une pénicilline par la bêta-lactamase

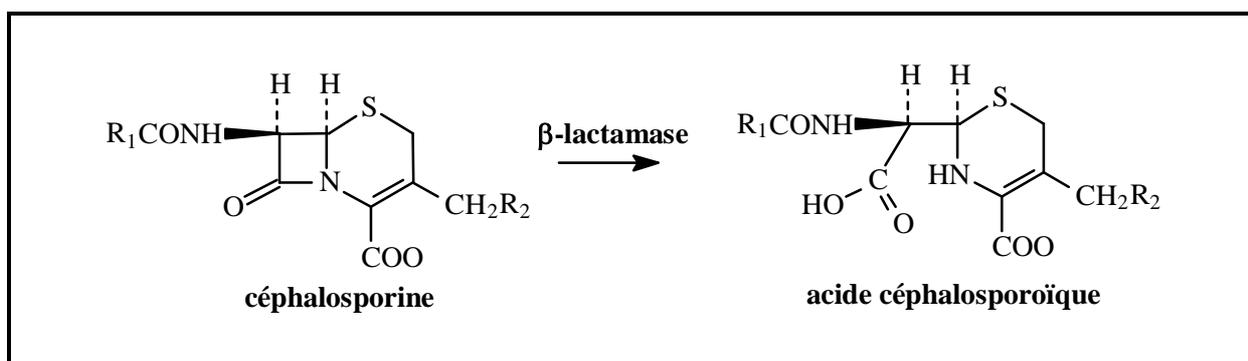


Figure 3 : Hydrolyse d'une céphalosporine par la bêta-lactamase

Les méthodes biochimiques sont basées sur l'ouverture du cycle bêta-lactame sous l'action de la bêta-lactamase. Il en résulte la formation d'acide pénicilloïque pour les pénicillines et d'acide céphalosporoïque pour les céphalosporines (Figures 2 et 3).

- La méthode acidimétrique est basée sur la modification du pH. On quantifie la bêta-lactamase présente dans le milieu réactionnel par la titration du nouveau groupe carboxyle formé après l'ouverture du cycle bêta-lactame. [Samuni , 1975].
- La modification électronique de la molécule de bêta-lactamine s'accompagne de l'absorption de la lumière. Cette propriété constitue la base de la méthode chromogénique ou spectrophotométrique. Le test à la nitrocéfine est une application de ce principe.
- Il existe des méthodes basées sur la mise en évidence de l'activité bêta-lactamase sur gel. Après la séparation par isoélectrofocalisation, du papier imbibé de céphaloridine, un substrat chromogène, est déposé sur le gel. L'hydrolyse du substrat se traduit par une coloration rose sur fond jaune [Matthew *et al*, 1975]. Bonnet *et al* [2000] proposent la séparation sur gel dénaturant de polyacrylamide puis la révélation avec la nitrocéfine.
- La méthode iodométrique est basée sur la réduction de l'iode entraînant une décoloration. Dans la méthode utilisée par Bonnet *et al* [2000] la révélation de l'activité bêta-lactamase se fait après isoélectrofocalisation sur gélose contenant le substrat pénicilline G, de l'iodure de potassium et de l'iode.

2.3.3. Méthodes de la biologie moléculaire

Les premières méthodes d'étude des BLSE ont utilisé le pH isoélectrique comme caractère spécifique d'identification. De nos jours, avec plus d'une centaine d'enzyme de type TEM, des bêta-lactamases génétiquement distinctes peuvent avoir un même pH isoélectrique [Bradford, 2001].

La méthode moléculaire la plus courante de détection des bêta-lactamases est la PCR "Polymerase Chain Reaction" utilisant des amorces oligonucléotidiques spécifiques pour les différentes familles de bêta-lactamases. Les membres d'une même famille de bêta-lactamases ne se différenciant que par des mutations qui affectent un ou deux acides aminés de la chaîne polypeptidique, seul le séquençage du gène permet l'identification complète de l'enzyme.

La PCR :

Les oligonucléotides utilisés sont complémentaires à l'ADN de régions généralement exemptes de mutations ponctuelles. Cette technique ne permet donc pas de distinguer les membres des familles CTX-M, TEM ou SHV les uns des autres.

Cependant, des méthodes ont été développées dans le but d'une identification partielle des variantes au sein d'une même famille. Ainsi, Ouelette *et al* [1988] ont proposé des oligonucléotides qui permettent la distinction de TEM1 et TEM2.

PCR-RFLP : (-Restriction Fragment Length Polymorphism).

Cette méthode consiste à soumettre les produits de l'amplification à un clivage par des endonucléases de restriction. L'analyse des fragments par électrophorèse indique les sites de mutation dans le gène de la bêta-lactamase.

L'application de cette méthode aux gènes bla_{TEM} permet de détecter des mutations ponctuelles après le clivage par plusieurs endonucléases de restriction [Bradford, 2001].

Elle permet également de détecter la mutation spécifique de l'acide aminé 238 chez les gènes de type SHV. En effet, suite à l'amplification génique, le clivage de l'ADN avec l'enzyme de restriction *NheI* permet la mise en évidence de la mutation de la guanine en adénine qui se traduit par le remplacement de la glycine par la sérine à la position 238 de la chaîne polypeptidique. Cette substitution d'acide aminé est commune à la plupart des premiers membres de la famille SHV.

PCR-SSCP : (-Single Strand Conformation Polymorphism).

L'ADN sous forme de simple brin a une structure secondaire qui dépend de sa séquence, du tampon et de la température. C'est cette propriété qui est exploitée par la méthode SSCP.

Après l'amplification génique, l'ADN est dénaturé puis digéré par des endonucléases de restriction. La spécificité de cette méthode est l'analyse des fragments sur gel de polyacrylamide non-dénaturant permettant une grande résolution.

On obtient les meilleurs résultats lorsque la taille des fragments générés est comprise entre 310 et 320 paires de bases [Cockerill F. R., 1999]. Appliquée aux gènes de type SHV, elle permet de détecter une mutation affectant une unique base : des oligonucléotides appropriés permettent de générer un amplimère dans la région codante du gène SHV. Après clivage avec l'enzyme *Pst*, l'analyse des fragments sur gel de polyacrylamide à 20% permet de distinguer SHV 1, 2, 3, 4, 5 et 7 [Bradford, 2001].

La méthode LCR : (Ligase Chain Reaction).

Elle permet l'identification de séquences d'ADN qui ne diffèrent que par une paire de bases. Quatre oligonucléotides complémentaires à la séquence cible d'ADN sont soumis à l'hybridation en présence d'une ligase thermostable. Dans le cas des gènes bla_{SHV} , la séquence d'ADN à analyser est mise en contact avec des oligonucléotides biotinylés [Bradford, 2001].

Hybridation de fragments d'ADN :

On emploie également la technique classique de "Southern-blott" en utilisant une sonde d'ADN avec une séquence connue. L'ADN total des souches à analyser est transféré sur membrane de nitrocellulose après digestion avec des endonucléases de restriction. L'échantillon contenant le ou les gènes recherchés marqués avec des enzymes (méthode colorimétrique) ou par luminescence est soumis à l'hybridation avec les fragments fixés sur la membrane [Olive *et al*, 1999].

PGFE : (Pulsed Field Gel Electrophoresis).

L'électrophorèse en champ pulsé, permet de déterminer le degré de parenté entre différents isolats. Les bactéries sont lysées *in situ* dans de l'agarose et leur ADN est digéré par des enzymes de restriction.

L'électrophorèse en champ pulsé permet la séparation de fragments d'ADN de 10 à 800 kb [Olive *et al*, 1999]. Tenover *et al* [1997] ont proposé un schéma d'interprétation des bandes obtenues après l'analyse des fragments. La présence de mêmes bandes chez des échantillons laisse conclure à une souche unique. Une mutation provoque une différence portant sur une à trois bandes. Si la différence porte sur plus de six bandes on conclut à des souches phylogénétiquement éloignées.

La méthode Rep PCR : (Rep pour répétitive).

Elle permet l'amplification de séquences répétitives en dehors de la région codante du gène. Ces éléments répétitifs disséminés dans le génome bactérien permettent le typage de souches dans le but d'établir leur degré de parenté. C'est un outil épidémiologique permettant d'établir si une prolifération de souches multirésistantes dans un service hospitalier est due à une même souche.

Le séquençage :

Il constitue la meilleure méthode d'identification des produits de la PCR d'une séquence d'ADN donnée. Cette méthode n'est pas adaptée à l'usage courant en microbiologie clinique compte tenu de sa complexité. Même dans les pays du Nord, son usage est limité aux centres de surveillance épidémiologiques.

La région d'ADN à analyser est d'abord amplifiée puis soumise au séquençage généralement par la méthode des dideoxynucleotides. Les amorces utilisées sont marquées à l'extrémité 5' par une couleur fluorescente correspondant à chacun des quatre nucléotides. La réaction se déroule dans des automates qui à l'aide de logiciels appropriés déterminent la séquence d'ADN [Cockerill, 1999 ; Olive *et al*, 1999].

La PCR-RFLP, la Rep-PCR, la PCR-SSCP et la PGFE constituent des méthodes adaptées au typage de souches bactériennes afin de déterminer leur degré de parenté ou pour l'identification d'un isolat.

3. *ESCHERICHIA COLI*

3.1. Caractéristiques

Isolé pour la première fois par Théodore Escherich en 1885 dans les selles de nourrissons, *Escherichia coli* est un coliforme fécal généralement commensal. Son établissement dans le tractus digestif de l'homme et des animaux à sang chaud s'effectue dans les premières heures ou journées après la naissance. Cependant, certaines souches peuvent être pathogènes. Bacille à Gram négatif mobile de la famille des *Enterobacteriaceae*, elle possède une ciliature péritriche. Cette bactérie très étudiée est un modèle couramment utilisé en biologie moléculaire [Berche *et al*, 1989 ; Flandrois, 1997].

Escherichia coli est un hôte normal de l'intestin : il représente près de 80% de la flore aérobie de l'adulte. On peut le retrouver également au niveau de diverses muqueuses chez l'homme et les animaux [Ferron, 1992 ; Flandrois, 1997].

3.2. Pathologies liées à *Escherichia coli*

Escherichia coli est l'une des espèces bactériennes la plus souvent rencontrée en pathologie humaine. C'est un groupe formé d'agents infectieux très hétérogènes aux potentialités pathogènes multiples. Les bactéries de cette espèce constituent la majeure partie de la flore microbienne aérobie chez l'homme et de nombreux animaux.

Certaines souches sont virulentes et provoquent des entérites, des infections urinaires, des septicémies et méningites néonatales. D'autres appartiennent à la flore commensale et peuvent provoquer des infections chez les sujets aux défenses immunitaires faibles.

3.2.1. Les entérites

Les diarrhées infectieuses à *Escherichia coli* évoluent selon les facteurs de virulence codés par les gènes des souches pathogènes. Ces diarrhées sont critiques chez les enfants à cause de la déshydratation qu'elles entraînent. Les souches responsables de ces affections sont divisées en quatre grands groupes : Les souches entéro-pathogènes (EPEC), les souches entéro-toxinogènes (ETEC), les souches entéro-hémorragiques (EHEC) et les souches entéro-invasives (EIEC).

Les souches entéro-pathogènes adhèrent fortement aux entérocytes et provoquent des lésions des cellules épithéliales. Le gène du facteur d'adhérence est porté par un plasmide. Ces souches responsables des gastro-entérites infantiles sont aujourd'hui rarement rencontrées dans les pays développés. De nos jours elles se retrouvent principalement dans les pays en voie de développement où elles constituent un problème de santé pour les nourrissons.

Les souches entéro-toxinogènes sont assez répandues dans les pays en voie de développement où elles provoquent des diarrhées infantiles, la diarrhée des voyageurs et des intoxications alimentaires. Ces souches se fixent à la muqueuse intestinale grâce à de fins filaments codés par des plasmides. Elles produisent des entérotoxines dont les gènes sont également portés par des plasmides.

Les souches entéro-hémorragiques provoquent une diarrhée hémorragique qui peut être accompagnée d'un syndrome hémolytique dû à la sécrétion de cytotoxines. Les toxines secrétées proches de celles de *Shigella dysenteriae* de type 1, provoquent une thrombose dans la microcirculation intestinale et rénale. Ces souches bactériennes adhèrent à l'épithélium et entraînent des diarrhées hémorragiques non purulentes.

Les souches entéro-invasives sont responsables d'un syndrome dysentérique. Elles sont proches des shigelles par rapport à leurs caractéristiques biochimiques et antigéniques. Phagocytées par les cellules épithéliales, elles envahissent la muqueuse intestinale. Leur multiplication est sous le contrôle de gènes chromosomiques alors que l'interaction avec les cellules épithéliales est liée à des gènes plasmidiques. Ces souches sont surtout rencontrées dans les pays en voie de développement [Berche *et al*, 1989 ; Flandrois, 1997].

3.2.2. Les septicémies et les méningites néonatales

Escherichia coli est, après les streptocoques du groupe B le second germe le plus souvent responsable des méningites néonatales dans les pays développés. En Afrique subsaharienne par contre les entérobactéries sont les agents infectieux les plus fréquemment isolés au cours de cette pathologie avec une prédominance de *Escherichia coli* [Balaka *et al*, 2004]. C'est la bactérie la plus fréquemment isolée des septicémies (22,6% à 26%) [Rosenthal, 2002].

3.2.3. Les infections urinaires

L'appareil urinaire est infecté essentiellement par voie ascendante par des souches de *E. coli* d'origine fécale ; mais il convient de distinguer les infections basses vésicales des infections hautes rénales. Certains facteurs facilitent lorsqu'ils sont présents, cette colonisation. Parmi eux, il faut insister sur la présence d'adhésines piliées ou non piliées dont les récepteurs sont disséminés sur les cellules de l'appareil urinaire jusqu'au rein. Les souches de *E. coli* possédant de telles structures peuvent plus facilement coloniser et atteindre le haut appareil urinaire et causer des pyélonéphrites [Berche *et al*, 1989 ; Ferron, 1992].

Chez les patients en consultation externe ainsi que chez les patients hospitalisés, *Escherichia coli* est le germe le plus souvent isolé des infections urinaires (75 à 90% des cas) [Dromigny *et al*, 2005; Kothari *et al*, 2008].

L'infection du tractus urinaire est définie par la présence de bactéries dans les urines qui, normalement sont stériles [Fauchère, 1990]. L'infection du tractus urinaire est plus fréquemment observée chez la femme que chez l'homme. Les pyélonéphrites sont beaucoup plus fréquentes au cours de la gestation en partie à cause des reflux urétero-vésicaux et de la stase vésicale souvent observés au cours de la grossesse [Lomberg *et al*, 1984].

Ces infections doivent être systématiquement recherchées au cours de la grossesse, car elles sont souvent asymptomatiques [Berche *et al*, 1989]. Elles se font presque toujours par voie ascendante et par des bactéries commensales de l'intestin. Ce processus est normalement limité par l'effet de rinçage des voies urinaires réalisé par des mictions nombreuses et fréquentes. C'est le principal mécanisme de défense contre l'infection urinaire [Fauchère, 1990].

Les bactéries prolifèrent d'abord dans l'urine vésicale, provoquant fréquemment une leucocyturie secondaire et colonisant parfois la muqueuse vésicale : c'est la cystite [Fauchère, 1990]. Les pyélonéphrites aiguës sont des complications des cystites.

3.2.4. Traitement des infections du tractus urinaire

Principes généraux

Les antibiotiques, transformés ou non sont principalement éliminés de l'organisme par le foie (bile) et /ou les reins (urines). Certains produits sont éliminés exclusivement ou de façon prédominante par le rein et seront particulièrement indiqués pour traiter les infections du tractus urinaire s'ils sont excrétés sous forme active. Ainsi, sont éliminées principalement dans les urines : les pénicillines, les céphalosporines (exceptée la céfopérazone éliminée essentiellement par la bile), la vancomycine, la fosfomycine, les aminosides, le chloramphénicol et le thiamphénicol, les sulfamides, le triméthoprim, les quinolones et les nitrofuranes.

Le mécanisme de l'élimination urinaire est différent selon les antibiotiques : filtration glomérulaire pour les aminosides, sécrétion

tubulaire pour les pénicillines, ou les deux mécanismes pour certaines céphalosporines (céfamandole, céfuroxime). L'insuffisance rénale retarde donc l'élimination de ces antibiotiques, ce qui signifie que leur posologie doit être adaptée chez l'insuffisant rénal (espacement des prises et réduction des doses) [Chabbert, 1972].

Les pénicillines et certaines céphalosporines ne sont pas modifiées dans l'organisme ou subissent une transformation minime, habituellement inférieure à 5% de la dose administrée.

Antibiotiques utilisés chez la femme gestante

Parmi les antibiotiques à élimination rénale, certains sont peu utilisés au cours des infections du tractus urinaire de façon générale et en particulier chez la femme gestante à cause de leur toxicité : fosfomycine, phénicol.

Les pénicillines, les céphalosporines, les aminosides et les quinolones sont des antibiotiques utilisés lors des infections du tractus urinaire chez la femme gestante avec quelques restrictions :

- les aminosides sont potentiellement toxiques pour l'appareil cochléo-vestibulaire du fœtus. De plus, ils sont néphrotoxiques à des degrés divers. C'est pourquoi ils ne sont prescrits que si le pronostic vital est en jeu ou si la souche infectante n'est sensible qu'à cette famille d'antibiotiques.
- les quinolones sont préjudiciables à la croissance du fœtus. C'est pourquoi leur utilisation est limitée aux deuxième et troisième trimestre de la grossesse et seulement si la souche infectante n'est sensible qu'à cette famille d'antibiotiques.
- les bêta-lactamines constituent donc la seule famille d'antibiotiques utilisables chez la femme gestante pour le traitement des infections urinaires avec le minimum d'effets secondaires et de risques pour le fœtus [Berche *et al*, 1989 ; Avril *et al*, 1989 ; Paterson *et al*, 2005].

Au Bénin, l'ampicilline, l'amoxicilline, la céfalotine, la céfazoline, le ceftriaxone et la céfotaxime sont largement prescrites. La résistance induite

par les BGN par production de bêta-lactamases constitue un handicap important pour l'utilisation de ces antibiotiques.

3.3. Résistance de *Escherichia coli* aux bêta-lactamines

La résistance aux bêta-lactamines chez *Escherichia coli* est due principalement à la production de diverses bêta-lactamases: production d'enzymes de types TEM et SHV, production d'oxacillinases, hyperproduction de bêta-lactamases chromosomiques [Cao *et al*, 2002 ; Bert *et al*, 2005]. En juillet 2007, 163 bêta-lactamases de type TEM, 112 de type SHV et 32 de la famille OXA ont été répertoriés chez les *Enterobacteriaceae*. [<http://www.lahey.org/studies/webt.htm>].

Les non BLSE rencontrées chez *Escherichia coli* sont TEM1 et plus rarement TEM2 et SHV1 dont les gènes sont portés par des plasmides. TEM1 est la non BLSE la plus fréquente dans les isolats de *E. coli* où elle est responsable de 90% de la résistance à l'ampicilline [Bradford, 2001].

Les BLSE dérivés de TEM1, TEM2 et SHV1 sont responsables de la résistance à un grand nombre d'antibiotiques (des pénicillines aux récentes molécules de céphalosporines à spectre étendu).

La production d'enzymes de type IRT ("inhibitor resistant TEM"), insensibles à l'inhibition par l'acide clavulanique est de plus en plus observée. L'apparition de nouvelles familles de BLSE CTX-M, VEB, PER, complique l'efficacité d'une thérapie par les bêta-lactamines [Pitout *et al*, 1998 ; Bou *et al*, 2002 ; Bert *et al*, 2005].

4. GÉNÉRALITÉS SUR LES ESPÈCES VÉGÉTALES À ACTION ANTIMICROBIENNE UTILISÉES

Une partie (25 à 50 %) des produits pharmaceutiques utilisés en médecine occidentale dérive des végétaux. Les végétaux sont riches en métabolites secondaires dont les tanins, terpénoïdes, alcaloïdes, et flavonoïdes qui sont responsables des propriétés antimicrobiennes. Un grand nombre d'habitants des pays en développement (80%) recourt à la médecine

traditionnelle basée essentiellement sur les plantes médicinales [Cowan, 1999 ; Nascimento *et al*, 2000].

Les chercheurs valorisent et valident les connaissances ancestrales basées sur la thérapie par les plantes médicinales en effectuant des études cliniques pour mettre en évidence les propriétés curatives des végétaux. Une multitude de travaux a été réalisée sur les propriétés antibactériennes, antifongiques et antivirales des plantes.

4.1. Données botaniques et ethnopharmacologiques sur les espèces végétales utilisées

Les trente-huit espèces végétales utilisées dans nos travaux ont été choisies parmi celles qui soignent des affections dont l'origine peut être infectieuse ; elles ont été choisies principalement sur la base des données recueillies sur le continent africain et publiées par Neuwinger [2000]. Nous avons utilisé également les informations ethnopharmacologiques recueillies par Adjanohoun *et al* [1989]. Le Tableau I regroupe les données sur 36 espèces végétales utilisées dans le traitement de maladies infectieuses et est suivi d'une description détaillée de deux espèces végétales qui ont donné les meilleurs résultats au cours de notre étude.

Tableau I : Données botaniques et ethnopharmacologiques sur 36 espèces végétales utilisées pour leur action antimicrobienne

N°	Nom et Famille	Organe utilisé	Usages thérapeutiques
1	<i>Aloe barteri</i> (Aloeaceae)	Feuilles	Dysenterie
2	<i>Alstonia boonei</i> (Apocynaceae)	Feuilles, écorces	Gonococcie, pneumonie
3	<i>Annona senegalensis</i> (Annonaceae)	Feuilles	Dysenterie, diarrhée, conjonctivite
4	<i>Baillonella toxisperma</i> (Sapotaceae)	Écorces	Bronchites, infections vaginales

5	<i>Boswellia dalzielii</i> (<i>Burseraceae</i>)	Écorces	Syphilis
6	<i>Bridelia ferrugineae</i> (<i>Euphorbiaceae</i>)	Feuilles	Diarrhée, gonococcie, dysenterie
7	<i>Caloncoba welwitschii</i> (<i>Flacourtiaceae</i>)	Ecorces	Pneumonie
8	<i>Carapa procera</i> (<i>Meliaceae</i>)	Fruits	Gonococcie, syphilis
9	<i>Ceiba pentadra</i> (<i>Bombacaceae</i>)	Ecorces	Gonococcie, conjonctivite
10	<i>Clausena anisata</i> (<i>Rutaceae</i>)	Feuilles, tiges	Syphilis, pneumonie, dysenterie
11	<i>Cnestis ferruginea</i> (<i>Connaraceae</i>)	Feuilles	Dysenterie, pneumonie
12	<i>Combretum collinum</i> (<i>Combretaceae</i>)	Feuilles	Diarrhée
13	<i>Dacryodes edulis</i> (<i>Burceraceae</i>)	Ecorces	Diarrhée, tuberculose, infections génito-urinaires
14	<i>Enantia chloranta</i> (<i>Annonaceae</i>)	Ecorces	Tuberculose
15	<i>Ficus exasperata</i> (<i>Moraceae</i>)	Feuilles, tiges, écorces	Conjonctivite, gonococcie, Tuberculose
16	<i>Ficus mucuso</i> (<i>Moraceae</i>)	Ecorces	Otites, diarrhées
17	<i>Ficus platyphylla</i> Moraceae	Tiges, feuilles et écorces	Anites, lèpre
18	<i>Flacourtia flavsecens</i> (<i>Flacourtiaceae</i>)	Feuilles	Dysenterie, diarrhée, dermatoses
19	<i>Grewia barteri</i> (<i>Tiliaceae</i>)	Feuilles, racines	Dysenterie
20	<i>Hexalobus crispiflorus</i> (<i>Annonaceae</i>)	Ecorces	Furoncles, maladies vénéériennes
21	<i>Ipomoea batatas</i> (<i>Convolvovulaceae</i>)	Feuilles	Dysenterie

22	<i>Irvingia gabonensis</i> (Simaroubaceae)	Ecorces	Dysenterie, diarrhée, gonococcie
23	<i>Kalanchoe crenata</i> (Crassulaceae)	Feuilles	Otites, varicelle
24	<i>Kleinedoxa gabonensis</i> (Simaroubaceae)	Ecorces	Toux
25	<i>Mallotus oppositifolius</i> (Euphorbiaceae)	Feuilles	Syphilis, infections urinaires
26	<i>Musanga cecropioides</i> (Moraceae)	Ecorces	Maux de dents, diarrhée
27	<i>Pachypodanthium staudtii</i> (Annonaceae)	Ecorces	Maux de dents, variole
28	<i>Persea americana</i> (Lauraceae)	Feuilles, tiges graines	Diarrhée, dysenterie, maux de dents
29	<i>Picralima nitida</i> (Apocynaceae)	Ecorces	Pneumonie, infections génito-urinaires
30	<i>Piptadeniastrum africanum</i> (Mimosaceae)	Ecorces	Blennorragie, pneumonie, infections génito-urinaires
31	<i>Psidium guajava</i> (Myrtaceae)	Écorces	Diarrhée, dysenterie
32	<i>Portulaca oleracea</i> (Portulacaceae)	Feuilles	Gonococcie, infections génito-urinaires
33	<i>Rytigynia canthioides</i> (Rubiaceae)	Feuilles	Diarrhée, dysenterie
34	<i>Trema orientalis</i> (Ulmaceae)	Feuilles	Gonococcie, dysenterie, pneumonie
35	<i>Tylophyra africana</i> (Asclepiadaceae)	Tiges, feuilles	Diarrhée
36	<i>Voacanga Africana</i> (Apocynaceae)	Écorces ou graines	Carie dentaire, plaies

***Canarium schweinfurthii* Engl.**

Genre et famille :

De la famille des Burceraceae et du genre *Canarium*, ce grand arbre est commercialisé sous le nom d'ailélé en Afrique centrale.

Description botanique et répartition géographique :

L'arbre peut atteindre 45 m de haut et son tronc 1,50 m de diamètre avec un feuillage constitué de grandes feuilles groupées en étoile aux extrémités des rameaux. L'écorce exsude une résine translucide aromatique devenant blanche opaque à jaune en se solidifiant.

Les feuilles sont alternes, composées, imparipennées pouvant atteindre 60 cm de longueur. Les limbes sont oblongs à lancéolés ou elliptiques de 8,5 cm sur 6 cm, pubescents à glabres. C'est une plante dioïque. Les fruits sont des drupes ellipsoïdes, violacées, à pulpe charnue.

Usages

Le fruit est comestible. La décoction des feuilles soigne la toux. Les graines grillées sont utilisées contre les dermatoses.

Les écorces sont utilisées dans le traitement des pneumonies, des bronchites et des douleurs post-partum. La décoction des écorces soigne la dysenterie et le chancre. Les vapeurs de la résine stoppent la montée laiteuse. Les écorces réduites en poudre soignent la variole [Neuwinger, 2000 ; <http://biodiversityinternational.org/publications/>].

Le bois s'utilise comme substitut de l'Okoumé dans la fabrication des contre-plaqués. Il s'utilise également en planches. La résine est brûlée comme encens ou pour allumer le feu [Walker *et al*, 1995].

***Terminalia superba* Engl. et Diels**

Genre et famille

Encore appelé *Terminalia altissima* A. Chev., ce grand arbre des zones tropicales appartient à la famille des Combretaceae et au genre *Terminalia*.

Les noms commerciaux sont afara, limba (en Afrique occidentale) et fraké (Afrique centrale).

Description botanique et répartition géographique

C'est un arbre haut de 25 à 50 m. Les feuilles alternes sont groupées au sommet des rameaux. Les limbes sont obovales de 12 à 18 cm de long sur 5 à 8 cm de large avec 7 à 8 nervures latérales très arquées. Les fleurs sont disposées en épis axillaires de 7 à 15 cm. Les fruits ailés sont larges de 4 à 5 cm, haut de 15 mm. Les ailes s'étendent en largeur et sont atténuées aux extrémités donnant au fruit un profil de pyramide écrasée. On le trouve de la Guinée jusqu'au Congo [Berhaut, 1974].

Usages

La pulpe des feuilles est utilisée contre les rhumatismes et les oedèmes. Les feuilles sont diurétiques. Elles sont également utilisées en bains de bouche dans le cas de gingivites, aphtes, toux et angines. Le suc des feuilles soigne la conjonctivite.

L'infusion des écorces soigne la dysenterie et les troubles ovariens. La macération des écorces est utilisée dans le traitement de la blennorragie, de la diarrhée, de la dysenterie et des infections orales [Neuwinger, 2000].



Terminalia superba (Combretaceae)



Canarium schweinfurthii (Burceraceae)

<http://users.telenet.be/sf16063/pauwels/CanaSchw.jpg>

4.2. Propriétés biologiques et pharmacologiques de quelques composés phytochimiques

4.2.1. Les alcaloïdes

Ce sont des composés cycliques azotés plus ou moins basiques, se trouvant à l'état naturel sous forme de sels. La morphine est un exemple d'alcaloïde à usage thérapeutique. Elle a été isolée en 1805 de l'opium (*Papaver somniferum*, Opiaceae). Les alcaloïdes sont utilisés pour leurs propriétés antimicrobiennes, antipaludiques (quinine), anti-tumorales (vinblastine), anesthésiques (curare, érythroidine) et stimulantes (caféine). La berbérine serait active vis-à-vis du trypanosome et du plasmodium. Cette action est due à sa propriété de s'intercaler entre les chaînes d'ADN de ces parasites [Bruneton, 1989 ; Cowan, 1999].

4.2.2. Les dérivés anthracéniques

On distingue les anthraquinones, les oxanthrones, les anthranols et les anthrones. Les anthraquinones sont caractérisées par la présence de composés phénoliques plus ou moins rattachés à l'anthracène. On note la présence d'un atome d'oxygène chez les anthrones et les anthranols. Ces composés sont souvent glycosylés : anthracénosides [Drug analysis]. Les dérivés anthracéniques sont responsables d'une activité laxative [Bruneton, 1989]. Les hétérosides anthracéniques sont ocytociques chez la femme enceinte. Certains hétérosides anthracéniques (hyperici), décrits comme antidépresseurs, auraient également des propriétés antimicrobiennes [Cowan, 1999].

4.2.3. Les coumarines

Ce sont des polyphénols caractérisés par un noyau α -benzopyrone. Elles peuvent être glycosylées : les furanocoumarines, les pyranocoumarines.

Leurs propriétés vaso-dilatatrices coronariennes, veino-toniques, anti-inflammatoires ont été décrites. Elles interviennent en cas d'insuffisance

veino-lymphatique, dans les troubles de la sénescence cérébrale et comme vasodilatatrices. Elles possèdent des propriétés anti-œdémateuses, immunostimulantes et cytotoxiques [Bruneton, 1989 ; Drug analysis]. On reconnaît également aux coumarines des propriétés antimycosiques sur *Candida albicans*. La warfarine utilisée comme anticoagulant aurait également des propriétés antivirales [Cowan, 1999].

4.2.4. Les saponosides

Ce sont des hétérosides à génines stéroïdiques (C₂₇) ou triterpéniques (C₃₀) caractérisés principalement par leurs pouvoirs hémolytiques et tensioactifs. Ils sont caractérisés par l'indice de mousse qui est déterminé par la hauteur de la mousse persistante d'un décocté aqueux de la drogue dans des conditions déterminées. Ils servent à la défense de la plante vis-à-vis d'agressions externes (antiviraux, antifongiques, antibactériens).

Les saponosides sont traditionnellement utilisés comme antitussifs et/ou expectorants, anti-inflammatoires et anti-œdémateux. Ils possèdent des activités antibactériennes, antifongiques, antiplasmodiales et molluscicides [Bruneton, 1989].

4.2.5. Les tanins

Ce sont des composés hydrosolubles capables de précipiter les alcaloïdes, les protéines (d'où leur nom de facteur antinutritionnel) et la gélatine. On les divise en deux grands groupes : les tanins hydrolysables et les tanins condensés. Les tanins hydrolysables sont des esters de sucres avec l'acide gallique ou l'acide ellagique. Les tanins catéchiques encore appelés proanthocyanidines sont des polymères de composés non hétérosidiques : ce sont des monomères de flavonoïdes qui constituent leurs molécules de base.

L'action toxique des tanins sur les bactéries et les levures a été rapportée. Par ailleurs, les tanins sont des molécules fébrifuges. Ils ont des

effets inhibiteurs sur la réplication des virus et sont donc en général des inhibiteurs enzymatiques. [Bruneton, 1989 ; Cowan, 1999].

4.2.6. Les mucilages

Les mucilages et les gommes sont des polysaccharides identiques sur le plan chimique. Les mucilages servent à la rétention de l'eau. Les gommes sont produites par la plante comme mécanisme de défense à la suite d'une agression externe. Les mucilages sont surtout abondants dans les graines des végétaux. Ils sont composés de sucres tels que l'arabinose, le glucose, le galactose, le xylose et d'acide uronique. On leur attribue des propriétés laxatives. Ils sont aussi utilisés comme excipients dans des préparations galéniques. [Daniel, 2005].

4.2.7. Les flavonoïdes

Ce sont des composés polyphénoliques responsables de la coloration des fleurs, de certains fruits et possédant aussi des propriétés thérapeutiques.

On distingue les flavones, les flavonols, les flavonones, les chalcones, les anthocyanes. Les flavones sont des composés contenant un groupe carbonyle. L'addition d'un groupe 3-hydroxyle donne un flavonol. Les anthocyanes sont des pigments végétaux dont la couleur varie en fonction du pH du milieu.

Les catéchines du thé vert ont montré in vitro une action inhibitrice sur la croissance de divers germes tels que *Vibrio cholerae*, *Streptococcus* et *Shigella*. On reconnaît aux flavonoïdes des propriétés antivirales (hespérétine, naringine), anti-plasmodiales (licocalcone A), cytotoxiques, anticancéreuses, anti-inflammatoires.

Les anthocyanes contenus dans la myrtille (*Vaccinium myrtillus*, Ericaceae) et dans la vigne rouge (*Vitis vinifera*, Vitaceae) sont utilisés en cas d'insuffisance veineuse. Ils sont également des accélérateurs de la

régénération du pourpre rétinien, et améliorent la circulation rétinienne. [Bruneton, 1989 ; Cowan, 1999].

4.2.8. Les terpènes et stéroïdes

Tous les composés terpéniques sont des polymères de l'isoprène (C₅). On distingue les monoterpènes (C₁₀), les sesquiterpènes (C₁₅) les diterpènes (C₂₀), les triterpènes (C₃₀). Lorsqu'une molécule d'oxygène est associée, on parle de terpénoïdes. L'artémisine est un sesquiterpénoïde. Les stéroïdes sont des triterpènes modifiés. Les composés terpéniques et stéroïdiques possèdent des propriétés antimalariques, cardiotoniques, contraceptives, anabolisantes et anti-inflammatoires [Bruneton, 1989 ; Cowan, 1999].

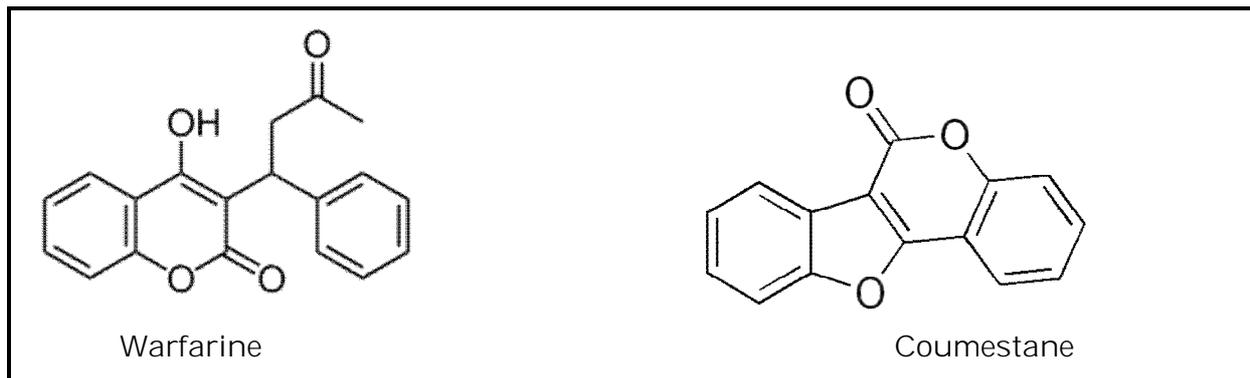
4.2.9. Les hétérosides cardiotoniques

Ce sont des molécules d'origine végétale comportant une génine stéroïdique de type cardénolide (en C₂₃) ou bufadienolide (en C₂₄) et une partie osidique le plus souvent oligosidique. Les hétérosides cardiotoniques augmentent la force et la vitesse de contraction du myocarde. Chez l'insuffisant cardiaque, ils diminuent la fréquence cardiaque par modification de la régulation neuro-végétative. Leur utilisation dans les troubles du rythme supra ventriculaire est due à leur capacité à ralentir la vitesse de conduction à la jonction auriculo-ventriculaire. Il n'y a pas d'action sur la conduction intra ventriculaire [Bruneton, 1989].

4.3. Structure chimique de quelques composés phytochimiques

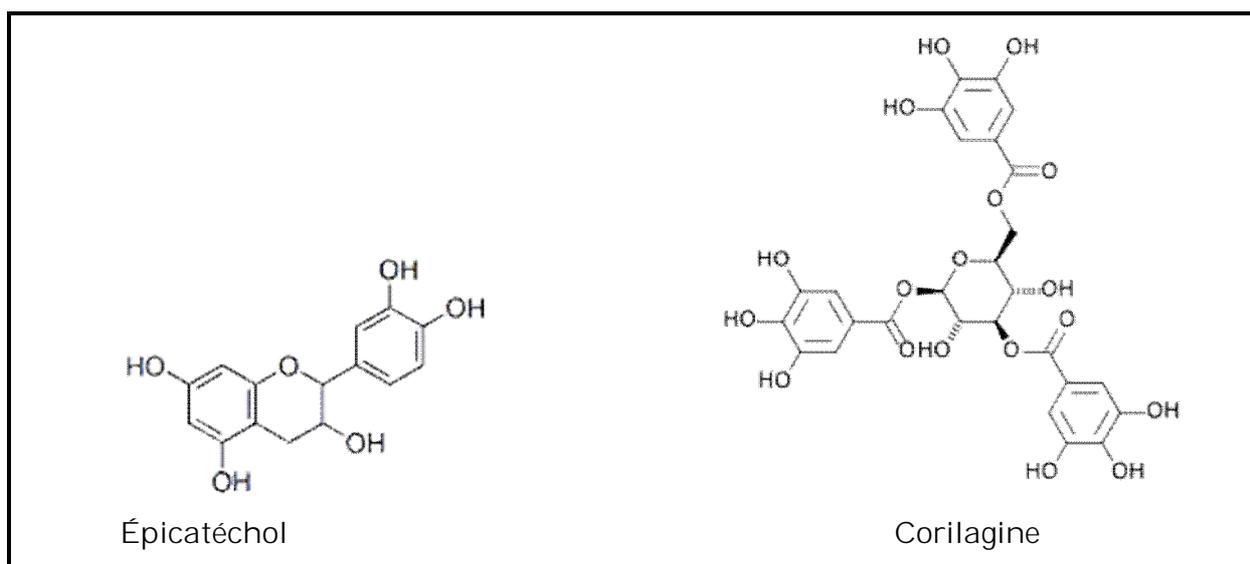
Coumarines

La warfarine est utilisée comme anticoagulant. Les coumestanes sont des phytoestrogènes.



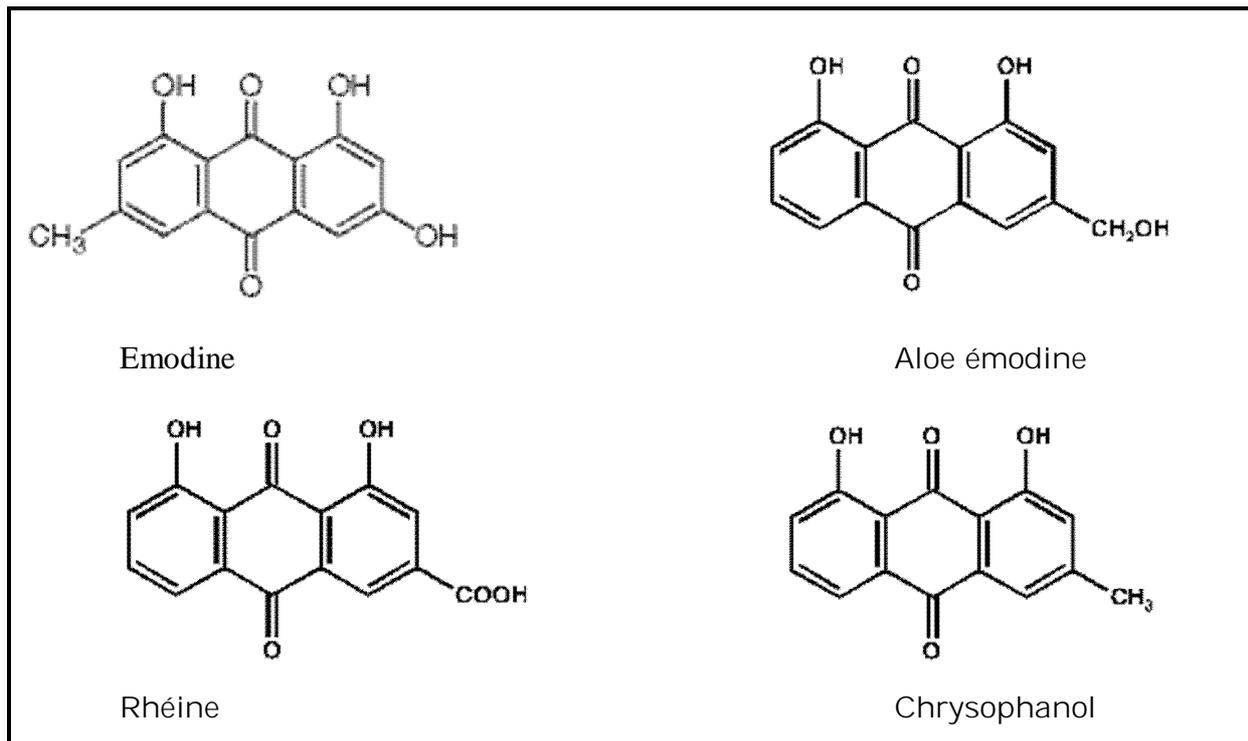
Tanins

L'épicatéchol est l'unité de base des procyanidols B1, B2, B3, contenus dans le thé ou le vin. La corilagine est un exemple de tanin hydrolysable.



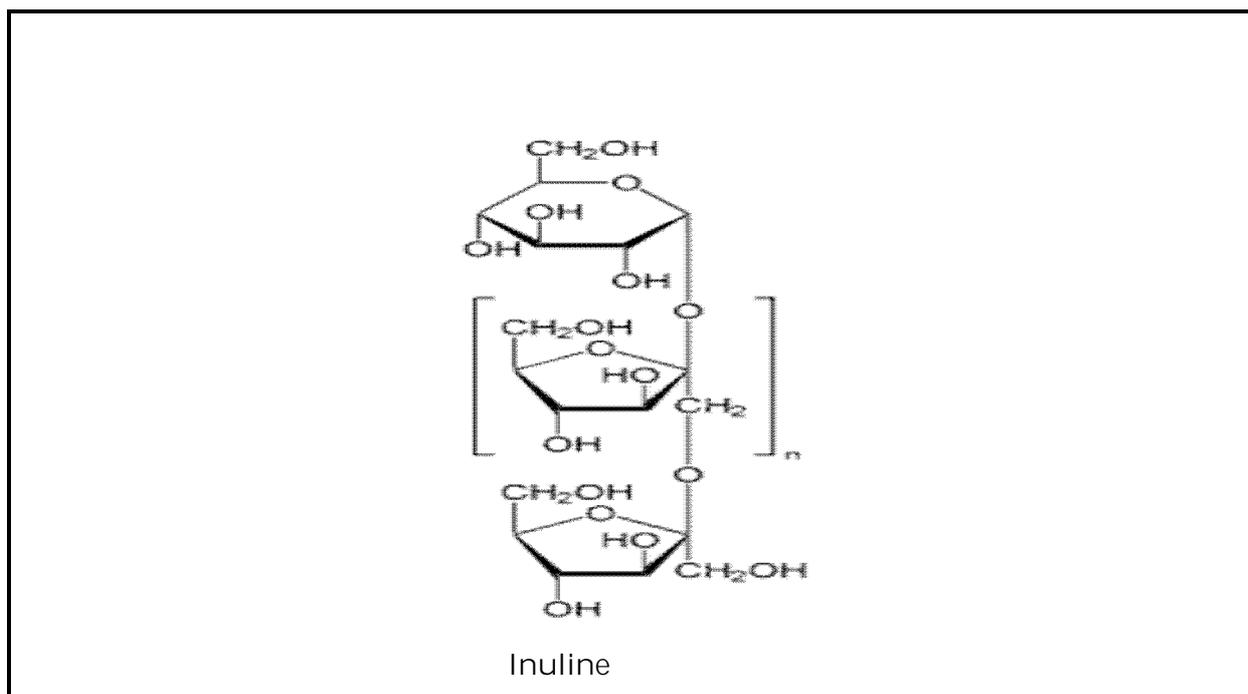
Dérivés anthracéniques

On retrouve la rhéine, l'émodyne, le Chrysophanol et l'aloé émodyne dans la rhubarbe (*Rhei rhadix*, Polygonaceae) ainsi que dans *Rheum palmatum* et *Rheum officinale*, Polygonaceae.

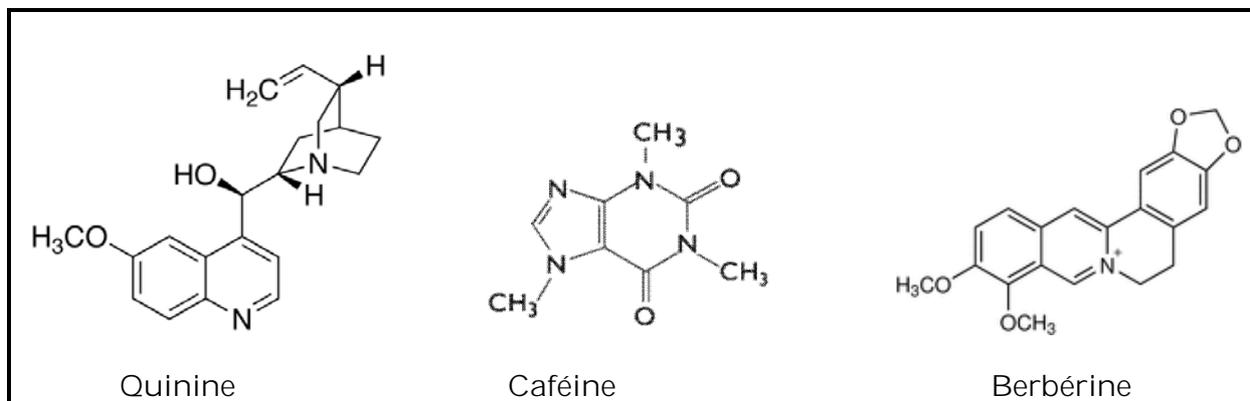


Mucilages

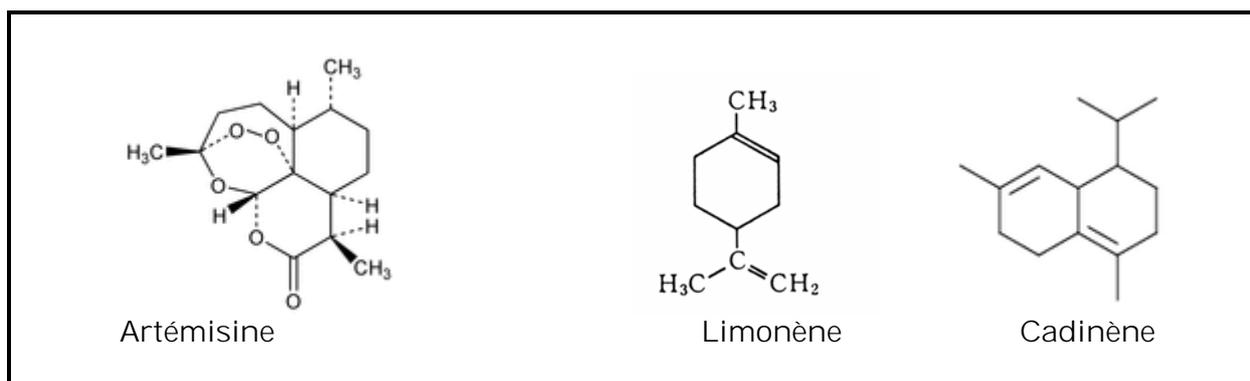
On trouve l'inuline dans les racines de la chicorée (*Echinacea angustifolia*, Asteraceae).



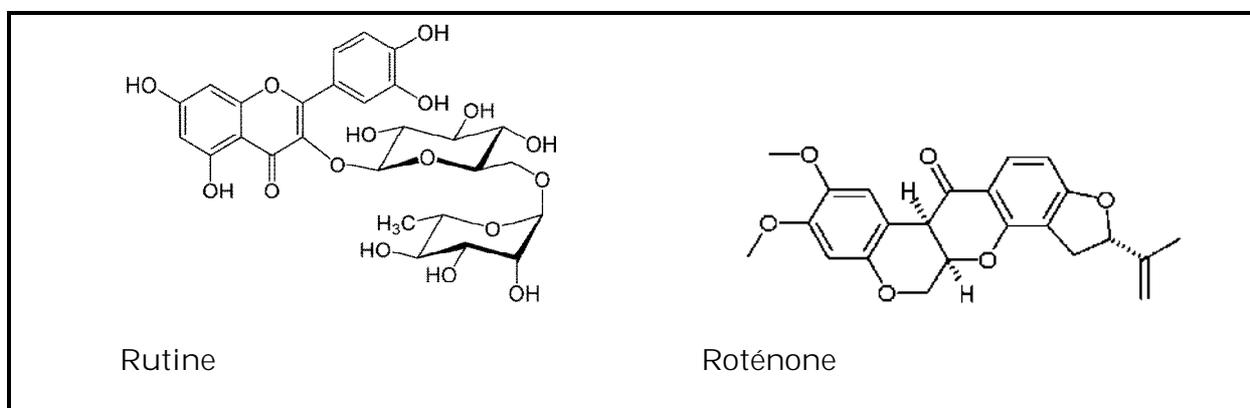
Alcaloïdes



Terpènes



Flavonoïdes



DEUXIÈME PARTIE :

INHIBITION DE LA CROISSANCE DES
SOUCHES DE *ESCHERICHIA COLI* PAR
LES EXTRAITS TOTAUX ÉTHANOLI-
QUES DE PLANTES

CHAPITRE 1 :

CADRE, MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. CADRE

L'isolement, la caractérisation microbiologique et les tests d'inhibition des souches de *Escherichia coli* ont été effectués au Laboratoire d'Analyses Biomédicales du Centre d'Information et de Recherche en Santé de la Reproduction (CIRSAR) sis à Cadjehoun, Cotonou. Les extraits de plantes ont été réalisés au Laboratoire de Pharmacognosie et des Huiles Essentielles (LAPHE) affilié à la Faculté des Sciences et Techniques et à la Faculté des Sciences de la Santé de l'Université d'Abomey-Calavi. La caractérisation génétique a été effectuée au Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire (LBBM) de la Faculté des Sciences et Techniques de l'Université d'Abomey-Calavi.

2. MATÉRIEL

2.1. Matériel végétal

Trente-huit espèces végétales de la pharmacopée africaine (voir annexe2) couramment utilisées dans le traitement de diverses maladies infectieuses ont été étudiées. Des essais bactériologiques d'inhibition de la croissance de souches de *E. coli* productrices de bêta-lactamases sont réalisés avec les organes (feuilles, fleurs, graines, écorces, racines, tiges etc.) de ces espèces végétales. La majorité des plantes a été récoltée sur le territoire béninois; cinq plantes proviennent du Nigéria et une du Cameroun (voir annexe1). Ces espèces ont été identifiées et authentifiées par le Laboratoire d'Ecologie Appliquée de la Faculté des Sciences Agronomiques de l'Université d'Abomey-Calavi, Bénin.

2.2. Souches bactériennes

Quatre-vingt-sept souches de *Escherichia coli* productrices de bêta-lactamases isolées des infections du tractus urinaire chez des femmes gestantes et des enfants.

La souche *E. coli* ATCC 25922 a servi de référence pour l'antibiogramme et la détermination des CMI. Elle a été utilisée également comme contrôle pour l'identification de *E. coli* et la recherche des gènes de bêta-lactamases.

La souche *Klebsiella pneumoniae* 1951 productrice de BLSE (haut niveau de résistance) a servi de référence pour l'amplification des gènes de la bêta-lactamase.

2.3. Milieux de culture

Les géloses Eosine Methylene Blue, Mueller-Hinton, Trypticase Soja, Chapman, Sabouraud et CLED proviennent de Bio-Rad (France). Les bouillons utilisés sont : Mueller-Hinton de Bio-Rad (France) et Luria Bertani (LB) du laboratoire Invitrogen (France).

2.4. Disques d'antibiotiques

Les disques d'antibiotiques (Bio-Rad, France) ont les charges suivantes déterminées par le fabricant pour les entérobactéries: amoxicilline (25µg), amoxicilline + acide clavulanique (20 :10 µg), céfalotine (30µg), céfazoline (30µg), aztréonam (30µg), cefotaxime (30µg), ceftriaxone (30µg), imipénème (10µg), doxycycline (30µg), minocycline (30µg), ciprofloxacine (5µg), ofloxacine (5 µg), acide nalidixique (30µg), nétilmycine (30µg), gentamycine (15µg) et sulfaméthoxazole-triméthoprimine (23,75 : 1,25 µg).

2.5. Réactifs pour l'amplification génique

Le chlorure de Magnésium, les nucléotides dATP, dCTP, dTTP , dGTP et l'agarose sont de Finzymes (Finlande). La Taq polymérase et le tampon d'amplification proviennent de Biolabs (USA).

Le marqueur de poids moléculaire utilisé contient les fragments suivants : 100, 200, 300, 400, 500, 600, 950, 1050, paires de bases.

Les amorces utilisées sont OT-1-F/ OT-2-R pour les gènes de la famille TEM, SHV-A / SHV-B pour les gènes de type SHV et CTX-U1 /CTX-U2 pour les gènes de type CTX-M.

OT-1-F (5'-TTGGGTGCACGAGTGGGTTA-3')

OT-2-R (5'-TAATTGTTGCCGGGAAGCTA-3')

SHV- A (5'-CACTCAAGGATGTATTGTG-3')

SHV-B (5'-TTAGCGTTGCCAGTGCTCG-3')

CTX-U1 (5'-ATG TGC AGY ACC AGT AAR GTK ATG GT-3')

CTX-U2 (5'-TGG GTR AAR TAR GTS ACC AGA AYC AGC GG -3')

Le tampon de charge :

Bleu de Bromophénol, xylène cyanol, glycérol, tampon Tris-HCl pH7.

Le tampon de migration :

Tris 0,89M ; Acide borique 0,89 M ; EDTA 0,5 M pH 8 .

3. MÉTHODES

3.1. Méthodes phytochimiques

3.1.1. Préparation des extraits totaux éthanoliques

Les organes séchés à l'abri du soleil à une température ambiante de 25 °C ont été réduits en poudre. A 100g de poudre on a ajouté 500ml d'éthanol à 96%. Le mélange a été soumis à une agitation continue pendant 72 heures, puis filtré. Le filtrat a été évaporé dans un évaporateur rotatif de type BÜCHI ROTAVAPOR R200. Le concentré a été séché à l'étuve à 50°C pendant 72 heures. L'extrait éthanolique obtenu a été utilisé pour les essais bactériologiques sur les souches ainsi que les tests d'inhibition de la bêta-lactamase.

3.1.2. Recherche des principales classes de composés phytochimiques

La mise en évidence des principaux composés phytochimiques a été effectuée sur la poudre de drogue selon la méthode de Houghton *et al* [1998]. Le Tableau II résume les principales réactions de mise en évidence des composés recherchés dans les organes de plantes.

Tableau II : Mise en évidence des composés phytochimiques

Composé	Réaction de caractérisation
Alcaloïdes	Mayer (iodomercurate de potassium) Dragendorff (iodobismuthate de potassium)
Tanins	Réaction au chlorure ferrique
Flavonoïdes	Shinoda (réaction à la cyanidine)
Anthocyanes	Colorations spécifiques en milieux acide et alcalin
Leucoanthocyanes	Réaction avec l'alcool chlorhydrique
Dérivés anthracéniques	Réaction en présence d'ammoniaque
Quinones	Bornträger (réaction entre cycles quinoniques en présence d'ammoniaque)
Stéroïdes et terpénoïdes	Réaction de Libermann-Burchard Réaction de Kedde spécifique aux cardénolides
Dérivés cyanogénétiques	Réactif de Grignard à l'acide picrique
Mucilages	Viscosité de l'infusé
Saponosides	Hauteur de la mousse
Coumarines	Fluorescence à 365 nm
Composés réducteurs	Réaction à la liqueur de Fehling

3.1.2.1. Recherche des alcaloïdes

Pour le test de Mayer, 5 g de poudre de l'organe de plante ont été imbibés de 5 ml d'ammoniaque dilué au 1/2 puis additionnés de 25 mL d'éther chloroformique (2 :1). Le mélange a été laissé en macération pendant

24 heures, filtré sur sulfate sodique anhydre puis épuisé avec de l'acide chlorhydrique à 5%. La phase aqueuse a été additionnée de V gouttes du réactif de Mayer. Une coloration jaunâtre indique une réaction positive.

Le test de Dragendorff a été réalisé sur une macération de 24 heures obtenue à partir de 10 g de poudre d'organe de plante dans 50 mL d'acide sulfurique dilué à 10%. V gouttes de réactif ont été ajoutées à 1 mL du filtrat de la macération. Un précipité orangé indique une réaction positive.

Le test de confirmation a été réalisé pour les composés ayant donné une réaction positive après extraction des alcaloïdes. A 25 mL du filtrat, on a ajouté 5 mL d'ammoniaque à 50% et 10 mL de chloroforme, puis la phase aqueuse a été recueillie et filtrée sur du sulfate de sodium anhydre.

Le filtrat a été chauffé jusqu'à évaporation totale et le résidu a été repris dans 5 mL d'acide chlorhydrique à 5%. X gouttes du réactif de Dragendorff ont été ajoutées. Un précipité orangé après 15 minutes indique une réaction positive.

3.1.2.2. Recherche des tanins

La recherche de tanins a été effectuée sur l'infusé à 10% de la drogue. On a ajouté au filtrat de l'infusé quelques gouttes d'une solution de chlorure ferrique à 1%. L'obtention d'une coloration verte ou bleu foncée indique une réaction positive. Pour la recherche spécifique des tanins catéchiques, on a ajouté à 10 mL du filtrat 5 mL du réactif de Stiasny (un volume de formol à 30% pour deux volumes de HCl concentré). Le mélange a été chauffé au bain-marie à 90°C pendant quelques minutes. L'apparition d'un précipité rose indique une réaction positive.

Le filtrat a été récupéré après la mise en évidence des tanins galliques. Il a été saturé d'acétate sodique, puis on a ajouté quelques gouttes de chlorure ferrique à 1% pour révéler la présence de tanins galliques. Une teinte bleue ou noire indique une réaction positive.

3.1.2.3. Mise en évidence des flavonoïdes

5 mL du filtrat de l'infusé à 10% ont été utilisés ; on a ajouté au filtrat un volume égal d'alcool chlorhydrique (éthanol à 50%, HCl concentré 2 :1 v/v) et une pincée de poudre de magnésium. L'observation d'une coloration orangée ou rouge traduit la présence de flavonoïdes. C'est la réaction dite de Shinoda.

3.1.2.4. Détection des anthocyanes et leucoanthocyanes

Cette réaction a été réalisée avec 1 mL du filtrat de l'infusé à 10%. On a ajouté quelques gouttes d'acide chlorhydrique à 5% puis un peu d'ammoniaque à 50%. L'apparition d'une coloration rouge qui s'accroît et vire au bleu violacé ou vert indique la présence d'anthocyanes.

On a ajouté de l'alcool chlorhydrique à 1 mL du filtrat de l'infusé à 10%, puis le mélange a été chauffé au bain-marie à 90°C. Une coloration rouge violacée ou rouge cerise indique la présence de leucoanthocyanes.

3.1.2.5. Recherche des dérivés quinoniques

On a réalisé la macération de 2 g de la poudre d'organe de plantes humectée avec 2 mL de HCl à 5% dans 20 mL de chloroforme pendant 24h. Après filtration, on a ajouté 5 mL d'ammoniaque à 50%. C'est la réaction de Bornträger. Une coloration rose à rouge violacée indique une réaction positive.

3.1.2.6. Mise en évidence des dérivés anthracéniques

Les dérivés anthracéniques libres ainsi que les dérivés anthracéniques combinés (O-hétérosides et C-hétérosides) ont été recherchés dans les différents organes des espèces végétales choisies.

Il a été réalisé un extrait chloroformique à 10% de poudre de drogue en chauffant le mélange au bain-marie à 90°C pendant trois minutes. Après filtration, on a effectué la recherche des dérivés anthracéniques libres sur le filtrat ; le résidu est utilisé pour la mise en évidence des dérivés anthracéniques combinés.

On a ensuite ajouté à 1 mL du filtrat 1 mL d'ammoniaque à 50%. Une coloration rouge d'intensité variable indique la présence de dérivés anthracéniques libres.

Pour la recherche des dérivés anthracéniques combinés O-hétérosides, on a utilisé une partie du résidu de la poudre épuisée par le chloroforme auquel on a ajouté 10 mL d'eau et 1 mL de HCl concentré. Le mélange a été chauffé au bain-marie à 90°C pendant 15 minutes, puis filtré. Une partie de l'hydrolysate ainsi obtenu a été mélangée avec du chloroforme à volume égal. La phase aqueuse a été utilisée pour la mise en évidence des C-hétérosides. La phase organique a été additionnée de 1 mL d'ammoniaque à 50%. Une coloration rouge apparaît en présence de composés anthracéniques O-hétérosides.

Les O-hétérosides à génines réduites sont recherchés en cas de réaction négative ou faiblement positive. On a ajouté à 5 mL de l'hydrolysate quelques gouttes de chlorure ferrique à 10%. Le mélange a été ensuite chauffé pendant 5 minutes au bain-marie à 90°C. On a ajouté 5 mL de chloroforme ; on a recueilli la phase organique à laquelle on a ajouté 1 mL d'ammoniaque à 50%. Une coloration rouge apparaît en présence de composés anthracéniques O-hétérosides à génines réduites.

La phase aqueuse conservée après extraction de l'hydrolysate a été additionnée de 1 mL de chlorure ferrique à 10%. Le mélange a été chauffé au bain-marie à 55°C pendant 30 minutes, puis additionné de 5 mL de chloroforme. A la phase chloroformique on a ajouté 1 mL d'ammoniaque à 50%. Une coloration rouge indique une réaction positive.

3.1.2.7. Recherche des stéroïdes et terpénoïdes

On a réalisé une teinture à 10% de la poudre de drogue dans de l'éthanol (70%) pendant 30 minutes. On a ajouté à la teinture un volume égal d'eau distillée puis de l'acétate de plomb à 10%. On a filtré et on a ajouté au filtrat, du phosphate disodique à 10%. Après une nouvelle filtration, on a effectué une extraction au chloroforme. La phase organique a été filtrée sur du sulfate sodique anhydre et évaporé à siccité. Le résidu a

servi à la mise en évidence des stéroïdes et terpénoïdes par la réaction de Liebermann-Burchard et à la détection des cardénolides par les réactions de Raymond et de Kedde.

Pour la réaction de Liebermann-Burchard, on a repris le résidu dans quelques gouttes d'acide acétique puis on a ajouté un mélange d'anhydride acétique et d'acide sulfurique concentré (50 :1). Une coloration violette indique une réaction positive.

On a ajouté successivement au résidu quelques gouttes d'une solution alcoolique de méta-nitrobenzène (1% dans l'éthanol) et quelques gouttes de NaOH à 20%. L'observation d'une coloration bleue indique une réaction positive. C'est la réaction de Raymond.

Dans la réaction de Kedde, le résidu a été additionné d'une solution alcoolique d'acide dinitrobenzoïque puis de NaOH 1N. On observe une coloration bleue en présence de cardénolides.

3.1.2.8. Recherche des dérivés cyanogénétiques

On a réalisé la macération de 2 g de la poudre de drogue dans 15 mL d'eau distillée pendant 1 heure dans un erlenmeyer. On a recouvert le col de l'erlenmeyer avec du papier imbibé d'acide picrique à 5% et on a chauffé quelques minutes. L'apparition d'une coloration marron indique la présence de dérivés cyanogénétiques.

3.1.2.9. Mise en évidence de saponosides

L'indice de mousse a été déterminé sur le filtrat du décocté à 1% de la poudre d'organe de plantes. On a réalisé des dilutions du filtrat dans des tubes qui ont été ensuite soumis à 30 agitations pendant 15 secondes. Après 15 minutes, on a mesuré la hauteur de la mousse formée, dont la valeur a servi au calcul de l'indice de mousse. La formule qui sert au calcul de l'indice de mousse I est la suivante :

$$I = h \times 5/t \times 10^{-2}$$

h étant la hauteur de la mousse (en cm) dans le tube t. La présence de saponines est confirmée par un indice de mousse supérieur à 100.

3.1.2.9. Recherche des mucilages

On a ajouté à 1mL du décocté à 10%, 5 mL d'alcool absolu. En cas de présence de mucilages dans l'organe de plante, on observe après 10 minutes un précipité floconneux.

3.1.2.10. Mise en évidence des coumarines

On a effectué une macération à 5% de la poudre de drogue dans l'éther pendant 24 heures. Après filtration, on a prélevé des aliquots de 5mL qu'on a laissé évaporer à l'air libre ; puis le résidu a été repris dans 2 mL d'eau distillée. La fluorescence a été observée à 365 nm après avoir ajouté une solution d'ammoniaque à 25% dans le tube test.

3.1.2.11. Recherche des composés réducteurs

Elle a été réalisée sur le décocté de la poudre de drogue à 10%. Après filtration, on a prélevé 5mL et on a laissé évaporer au bain-marie à 90°C. La réaction à la liqueur de Fehling a été réalisée sur le résidu.

3.2. Méthodes microbiologiques

3.2.1. Collecte des souches de *Escherichia coli*

3.2.1.1. Population d'étude

Les souches ont été isolées des prélèvements d'urine obtenus au cours des infections du tractus urinaire dans les centres de santé St Jean, Menontin et au Laboratoire de bactériologie du CIRSAR (Centre d'Information et de Recherche en Santé de la Reproduction) à Cotonou de septembre 2002 à Juin 2004. Les patients externes présentant les symptômes d'une infection urinaire ont été inclus dans l'étude ainsi que ceux hospitalisés et dont le prélèvement a été fait moins de 48 heures après l'hospitalisation. Ont été exclus de l'étude les patients sous traitement antibiotique ou antiseptique urinaire, ou venant de terminer un tel traitement il y a moins de deux semaines.

Les prélèvements d'urine de 1066 femmes gestantes et de 290 enfants de moins de 5 ans ont été analysés dans une étude prospective.

3.2.1.2. Prélèvement

Chez la femme, deux méthodes sont possibles :

- Recueil à la volée par la patiente :

On effectue une toilette vaginale pour éviter la souillure de l'échantillon. Le méat urinaire est ensuite désinfecté et environ 10mL d'urine est recueillie dans un flacon stérile fourni par le laboratoire.

- Recueil par sondage vésical :

Ici, il s'agit de placer une sonde urétrale à usage unique et de recueillir environ 10 mL d'urines vésicales dans un flacon stérile. Dans tous les cas, les urines doivent séjourner quatre heures au moins dans la vessie. Le prélèvement doit être acheminé immédiatement au laboratoire. L'examen cytobactériologique est effectué dans l'heure qui suit le prélèvement sinon l'échantillon est conservé à 4°C.

3.2.1.3. Examen et ensemencement

Les leucocytes ont été dénombrés à l'aide d'une cellule de Malassez. On a centrifugé 5 mL d'urines pendant 5 minutes à 3000 tours/min et le culot a été observé entre lame et lamelles. La présence de germes, parasites, leucocytes, hématies et cristaux a été notée. Une coloration de Gram a été également réalisée. 10 µL des urines diluées à 1% dans l'eau physiologique stérile ont été ensemencés sur le milieu CLED. Les milieux gélosés EMB, GS et Chapman ont été ensemencés avec les urines non diluées. L'incubation a été faite à 37°C pendant 18 h.

3.2.1.4. Interprétation de l'uroculture

La bactériurie (B) a été déterminée en comptant le nombre de colonies (N) sur le milieu CLED : $B = N \times 10\,000$. Une infection du tractus urinaire par *E. coli* est très probable lorsque la bactériurie est supérieure à 10^5 bactéries/mL et qu'elle est associée à une réaction leucocytaire (taux de

leucocytes $>10^4/\text{mL}$). Si la leucocyturie est inférieure à $10^4/\text{mL}$, on peut considérer qu'il s'agit d'une contamination par la flore urétrale.

Les BGN isolés sur EMB, sont retenus pour la suite de notre étude. L'identification de *Escherichia coli* est faite par la galerie API 20 E.

3.2.2. Caractérisation microbiologique des souches

3.2.2.1. Antibiogrammes des souches de *Escherichia coli*

L'antibiogramme a été réalisé sur gélose Mueller-Hinton dont la surface a été inondée avec l'inoculum ajusté à 10^6 bactéries/mL. On réalise une dilution au 1/100 d'une suspension correspondant à l'étalon 0,5 de l'échelle de Mac Farland (une colonie moyenne dans 5mL d'eau physiologique) [Sanofi Diagnostics, 1998].

Un premier antibiogramme a été réalisé dans le but de déterminer la sensibilité du germe vis-à-vis des antibiotiques prescrits couramment dans le traitement d'une infection urinaire.

A l'issue des résultats de cet antibiogramme, toute souche résistante à une bêta-lactamine a été retenue pour des analyses plus approfondies. Les souches sélectionnées ont été conservées selon le protocole de Courvallin *et al* [1985]: elles ont été ensemencées sur GTS inclinée et incubées à 37°C pendant 18h. On a ajouté du bouillon Mueller-Hinton (MH) additionné de 15% de glycérol. Les tubes ont été gardés à 4°C pendant 4h puis congelés à -20°C.

Un second antibiogramme a été réalisé afin de déterminer la sensibilité des souches retenues aux antibiotiques suivants : amoxicilline (AMX), amoxicilline + acide clavulanique (AMC), céfalotine (CF), céfazoline (CZ), ceftriaxone (CRO), aztréonam (ATM), céfotaxime (CTX), imipénème (IPM), doxycycline (D), ciprofloxacine (CIP), ofloxacine (OFX), acide nalidixique (NA), nétilmycine (NET), gentamycine (GM) et sulfaméthoxazole-triméthoprime (SXT). La classification des souches résistantes, intermédiaires ou sensibles à un antibiotique donné par rapport aux diamètres d'inhibitions a été effectuée conformément aux recommandations du fabricant des disques d'antibiotiques utilisés.

3.2.2.2. Détection de bêta-lactamases

La détection des bêta-lactamases a été réalisée en s'inspirant du test acidimétrique en tubes en milieu liquide de Syre [1981] décrit par Courvallin [1985].

Réactif

La solution a été préparée extemporanément avec 600 mg de benzylpénicilline. On a dissout la poudre dans 1 ml d'eau distillée stérile. On a ajouté du NaOH 1N pour amener le pH à 8. On a ajouté ensuite 100 µl de rouge de phénol à 1% dans l'eau distillée afin d'obtenir une coloration rouge pourpre.

Souche à étudier

Après repiquage de la souche sur EMB, une petite colonie a été mise en suspension dans du bouillon MH et incubée pendant 18 heures. A 0,75 ml d'eau physiologique, on a ajouté 100 µl de la suspension bactérienne et 150 µl du réactif à la benzylpénicilline. Les tubes ont été incubés à 37°C. La souche de référence de *Escherichia coli* ATCC 25922 a servi de témoin.

Interprétation

Après 1 heure d'incubation à 37°C, on observe un virage de la couleur du rouge pourpre initial à l'orangé ou au jaune dans les tubes contenant les souches productrices de bêta-lactamases.

3.2.2.3. Mise en évidence des BLSE

La BLSE a été recherchée chez les souches de *Escherichia coli* par la méthode de *Jarlier et al* [1988]. La gélose MH a été inondée avec une suspension bactérienne de 10⁶ bactéries par ml dans de l'eau physiologique selon les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie [2004]. Un disque d'amoxicilline + acide clavulanique (AMC) a été placé au centre de la boîte de Pétri et à 2 cm de ce dernier on a déposé les disques, d'aztréonam (ATM), de céfotaxime (CTX) et de ceftriaxone (CRO). La présence de BLSE se traduit par l'apparition d'un

double halo d'inhibition résultant de la synergie de la bêta-lactamine avec l'acide clavulanique.

3.2.2.4. Études statistiques

Le logiciel SPSS version 11.0 for Windows a été utilisé pour les analyses statistiques. Les données concernant le pourcentage de souches BLSE et non BLSE résistantes aux différents antibiotiques ont été analysées en utilisant le test non-paramétrique de Mann-Whitney. Les différences de résistance des souches BLSE et non BLSE à un antibiotique donné sont considérées statistiquement significatives au seuil de 0,05.

3.3. Caractérisation des souches par les méthodes de la biologie moléculaire

3.3.1. Extraction de l'ADN des souches de *Escherichia coli*

Les souches conservées à -20°C ont été repiquées sur gélose Mueller-Hinton. Une colonie a été transférée dans 5 mL de bouillon Luria Bertani. Après une incubation pendant 18h à 37°C , on a centrifugé 1,5 mL de la suspension bactérienne à 11 000 tours/min pendant 10 minutes. Les cellules bactériennes ont été lavées deux fois avec de l'eau distillée stérile puis reprises dans 500 μL d'eau distillée stérile. Cette suspension a été incubée pendant 10 minutes à 95°C afin de lyser les cellules. On a centrifugé pendant 10 minutes à 11 000 tours/min et le surnageant contenant l'ADN total a été conservé à -20°C pour la réalisation de l'amplification génique.

3.3.2. Amplification génique

La réaction d'amplification a été effectuée dans un thermocycler de type "T3 Biometra". Le volume réactionnel total de 30 μl est composé de :

- Tampon d'amplification,

- MgCl_2

à 1,5 mM

- dATP, dCTP, dGTP, dTTP à 0,2 mM chacun
- Oligonucléotides spécifiques à 0,5 μ M
- Taq polymerase 1,5 U

Les produits de l'amplification génique ont été analysés sur un gel d'agarose à 1,5%. Les conditions de réalisation de l'électrophorèse sont : 160 volts, 48 mA, migration pendant 1 heure.

3.3.3. Recherche des gènes bla_{TEM}

Les amorces utilisées sont OT-1-F et OT-2-R générant un fragment de 465 paires de bases [Gangoue-Pieboji *et al* 2005]. Pour l'amplification génique, les échantillons ont été soumis à une dénaturation à 94°C pendant 5 minutes suivie de 30 cycles composés chacun de : une hybridation à 52°C pendant 30 secondes, une élongation à 72°C pendant 60 secondes et une dénaturation à 94°C pendant 30 secondes. L'élongation finale a été effectuée à 72°C et a duré 10 minutes.

3.3.4. Mise en évidence des gènes bla_{SHV}

Les amorces (SHV-A et SHV-B) utilisées génèrent un fragment de 885 paires de bases. L'amplification a été réalisée dans les conditions suivantes : une dénaturation de 15 secondes à 96°C suivie de 30 cycles comprenant une dénaturation de 25 secondes à 96°C, une hybridation pendant 15 secondes à 50 °C et une élongation pendant 15 secondes à 72°C. L'élongation finale a duré 2 minutes à 72°C [Pitout, *et al* 1998].

3.3.5. Recherche des gènes de la famille CTX-M

Les amorces nucléotidiques (CTX-U1 et CTX-U2) utilisées amplifient une région commune aux gènes de la famille CTX-M. Les paramètres de l'amplification ont été : une dénaturation initiale à 94°C pendant 7 minutes, suivie de 35 cycles de dénaturation à 94°C pendant 50 secondes,

hybridation à 50°C pendant 40 secondes et extension de 60 secondes à 72°C. L'extension finale a été réalisée à 72°C pendant 5 minutes [Pagani, et al 2003]. Le fragment généré est de 593 paires de bases.

3.4. Tests d'inhibition de la croissance des souches de *Escherichia coli*

3.4.1. Préparation des extraits éthanoliques

L'extrait éthanolique a été repris dans de l'eau physiologique stérile à la concentration de 200 mg/mL. Cette solution a été stérilisée par filtration avec une membrane dont les pores ont un diamètre de 0,2 µm.

Afin de vérifier l'absence de contaminants, les extraits éthanoliques de plante ont été ensemencés sur gélose GTS et Sabouraud.

3.4.2. Réalisation de la suspension bactérienne

La souche conservée a été repiquée sur gélose EMB; puis une colonie a été mise en suspension dans du bouillon MH de manière à obtenir une concentration de 10⁶ bactéries par mL. A 200 µl de cette suspension, on a ajouté 200µl d'extrait total éthanolique et on a incubé à 37°C pendant 18 heures. Le lendemain on a ensemencé des dilutions du tube témoin sans extrait de plante et des tubes servant aux tests d'inhibition de la croissance des souches de manière à obtenir des colonies dénombrables.

3.4.3. Expression des résultats

Le pourcentage d'inhibition est déterminé de la façon suivante :

$$\frac{\text{Nombre de colonies (Suspension bactérienne + extrait)}}{\text{Nombre de colonies (Suspension bactérienne sans extrait)}} \times 100 \quad \%$$

3.5. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des extraits de plante sur des souches de *E. coli*

3.5.1. Préparation de la gamme de dilutions des extraits végétaux

L'extrait végétal a été dissout dans l'eau distillée à une concentration de 100 mg/mL. Cette solution a été stérilisée par filtration sur une membrane dont les pores ont un diamètre de 0,2 μm . La stérilité a été vérifiée par ensemencement sur gélose MH. Les dilutions de 10 mg/mL à 0,5 mg/mL ont été réalisées dans l'eau distillée stérile pour un volume total de 2 mL.

3.5.2. Détermination des CMI des extraits végétaux

Premier jour

Dans un petit tube à vis contenant 5 mL de bouillon Mueller-Hinton on a ensemencé une colonie moyenne de *E. coli*. Cette suspension a été incubée à 37 °C pendant 18h.

Deuxième jour

La suspension bactérienne a été diluée à 1/100. Cette dilution a une concentration d'environ 10^6 bactéries /mL. Dans des boîtes de Pétri, on a mélangé 2 mL de chaque dilution de la gamme de dilutions d'extraits végétaux et 18 mL de gélose MH fondue. Après homogénéisation, on a laissé solidifier, puis les boîtes de Pétri ont été séchées pendant 30 min à 37°C. On a ensemencé la dilution de la suspension bactérienne sur les boîtes de Pétri puis on a incubé à 37°C pendant 18 h.

Troisième jour

La croissance des germes sur les boîtes de Pétri est évaluée par comptage des colonies. La CMI est la concentration la plus faible pour laquelle il n'y a pas de croissance visible de germes.

CHAPITRE 2 :

RÉSULTATS

1. CARACTÉRISATION DES SOUCHES DE *E. COLI*

1.1. Tests de détection des bêta-lactamases

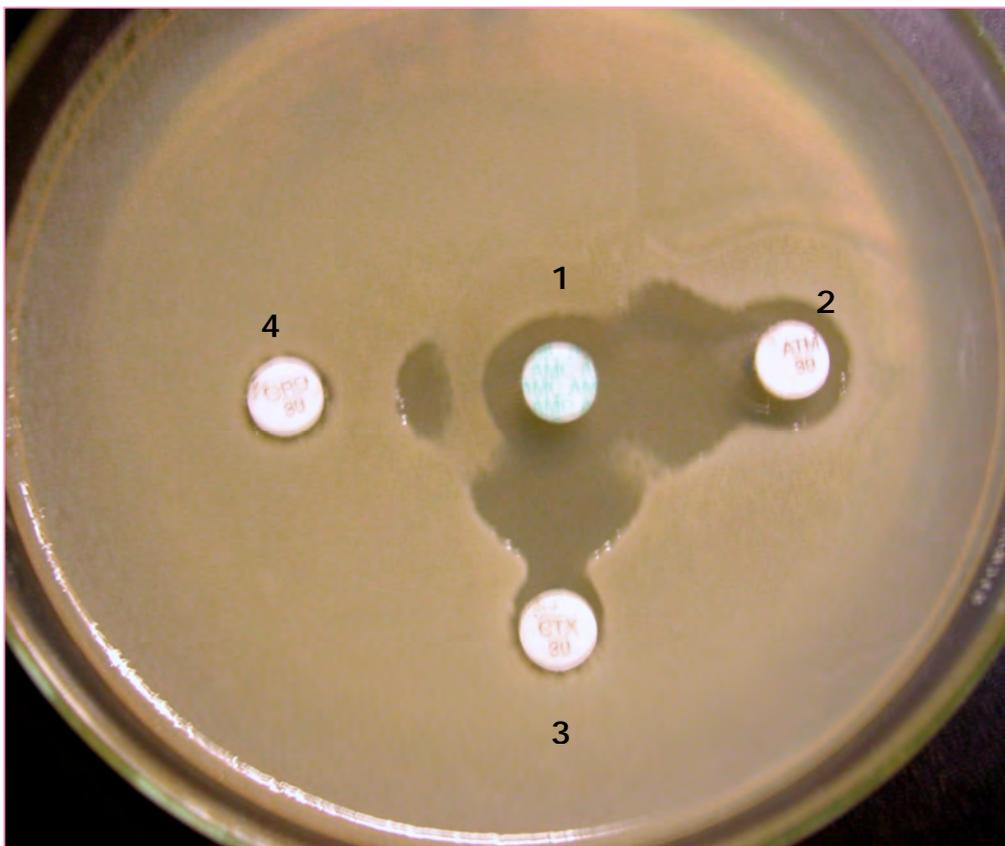


Figure 4 : Détection de la BLSE par la méthode modifiée de Jarlier [1988].

Les disques d'antibiotiques déposés sont : 1 = amoxicilline + acide clavulanique.

2 = aztréonam. 3 = céfotaxime. 4 = ceftriaxone.

La Figure 4 montre la synergie entre l'acide clavulanique et les bêta-lactamines testées qui se traduit par un élargissement de la zone d'inhibition comprise entre le disque d'AMC (1), les disques d'aztréonam (2) et de céfotaxime (3) respectivement. La ceftriaxone (4) subit une inactivation totale par la bêta-lactamase ; on remarque une zone d'inhibition dans la partie où l'inhibiteur et cette céphalosporine ont diffusé.

Au total 87 souches de *Escherichia coli* ont été isolées des infections urinaires durant la période de la collecte des souches. A l'issue de

l'antibiogramme sur gélose MH, 81 souches sont résistantes à au moins une bêta-lactamine. La détection des bêta-lactamases, basée sur le test acidimétrique en tubes en milieu liquide de Syre [1981] décrit par Courvallin [1985], a révélé 74 souches productrices de bêta-lactamases, soit 91,3% des souches résistantes aux bêta-lactamines. Onze souches productrices de BLSE ont été identifiées, soit 14,8% des souches productrices de bêta-lactamases correspondant à 12,6% des souches isolées des infections urinaires.

1.2. Phénotype de résistance des souches aux antibiotiques

Tableau III : Résistance de 74 souches de E. coli productrices de bêta-lactamases (63 souches non BLSE et 11 souches BLSE) aux antibiotiques

Antibiotiques	Pourcentage de résistance des souches BLSE	Pourcentage de résistance des souches non-BLSE	p
AMX	100	100	>0,05
AMC	72	9	<0,001*
CF	100	53	<0,05*
CZ	100	42	<0,05*
ATM	90	0	<0,001*
CRO	82	0	<0,001*
CTX	82	0	<0,001*
IPM	9	0	0,016*
D	100	90	0,28
CIP	18	14	0,74
OFX	18	7	0,29
NA	45	26	0,17
NET	45	23	0,14
GM	27	36	0,55
SXT	100	89	>0,05

* p <0,05 indique une différence statistiquement significative entre les pourcentages des souches BLSE et non BLSE résistantes à un antibiotique donné.

Le profil de résistance de 74 souches de *E. coli* productrices de bêta-lactamases est indiqué dans le Tableau III. Pour chaque antibiotique testé la différence entre le nombre de souches BLSE résistantes et le nombre de souches non BLSE résistantes est significative au seuil de 0,05. Les souches BLSE sont plus résistantes que les souches non BLSE aux antibiotiques suivants : amoxicilline (AMX), amoxicilline + acide clavulanique (AMC), céfalotine (CF), céfazoline (CZ), aztréonam (ATM), ceftriaxone (CRO), céfotaxime (CTX), et imipénème (IPM).

1.4. Recherche des gènes de bêta-lactamases

1.4.1. Recherche des gènes de type TEM

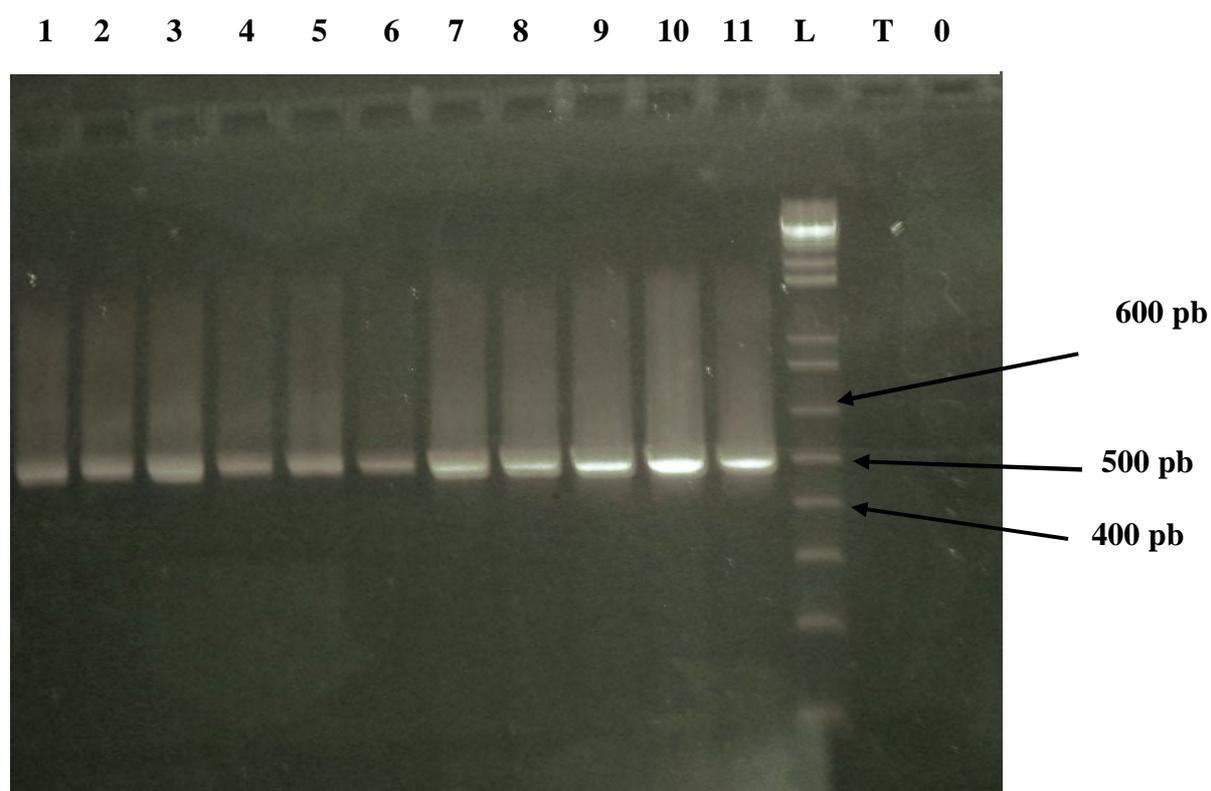


Figure 5 : L'amplification de l'ADN total des 11 souches productrices de BLSE.

On observe de gauche à droite les 11 souches BLSE, le marqueur de poids moléculaire (L), une souche productrice de SHV (T), et 0 le témoin négatif sans ADN.

Le génotypage de 11 souches de *Escherichia coli* productrices de BLSE montre la présence du fragment de 465 paires de bases après analyse des produits de l'amplification sur gel d'agarose (Figure 5). En effet, le fragment d'ADN amplifié est proche de la bande des 500 pb du marqueur de poids moléculaire. L'analyse de l'ADN total des souches non BLSE montre qu'elles possèdent un gène bla_{TEM} probablement TEM1 ou TEM2 mis en évidence par la bande typique de 465 bp (Figure 6).

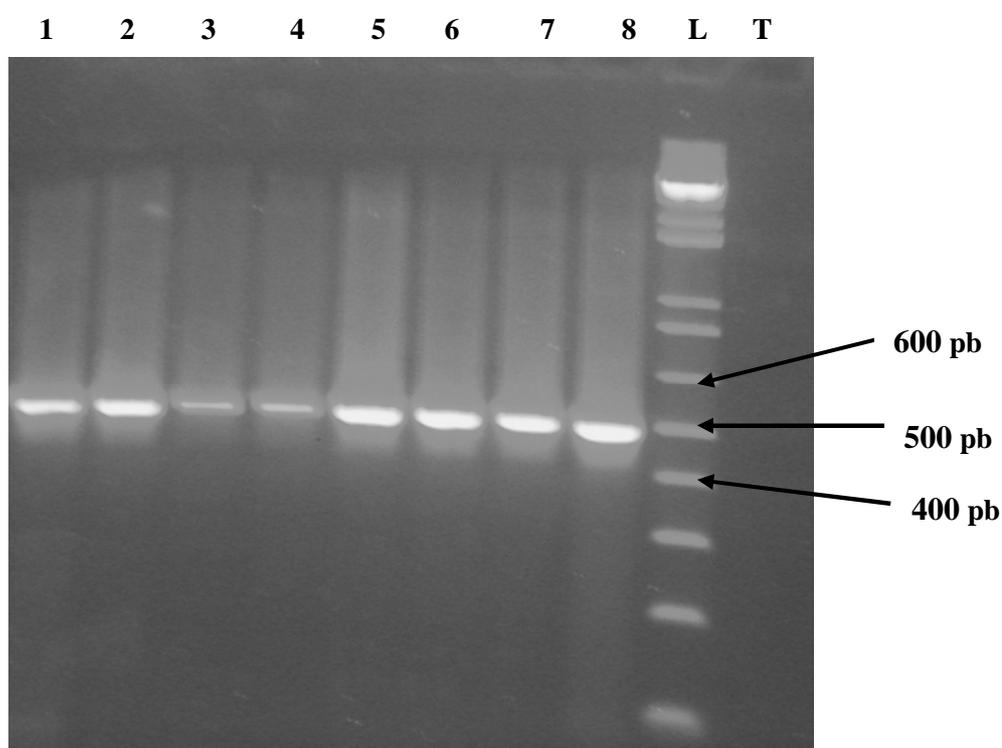


Figure 6 : Analyse sur gel d'agarose du produit d'amplification de l'ADN total des souches productrices de bêta-lactamases.

Les puits 1 à 7 contiennent l'ADN de souches non BLSE et le puit 8 l'ADN d'une souche BLSE de type TEM.

1.4.2. Recherche des gènes de type SHV et CTX-M

Le génotypage avec les amorces spécifiques des gènes de type SHV et CTX-M a montré l'absence de ces gènes chez les souches analysées. La Figure 7 montre la migration sur gel d'agarose des produits de l'amplification avec les amorces, des gènes de type SHV.

Il n'y a pas eu d'amplification génique chez les souches de *E. coli* collectées dans le cadre des recherches. La souche de *Klebsiella pneumoniae* 1951 productrice de BLSE qui a été utilisée comme témoin positif a généré le fragment de 887 pb attendu en présence des gènes de type SHV. Sur le gel d'agarose, cette bande est très proche de celle de 850 pb du marqueur de poids moléculaire.

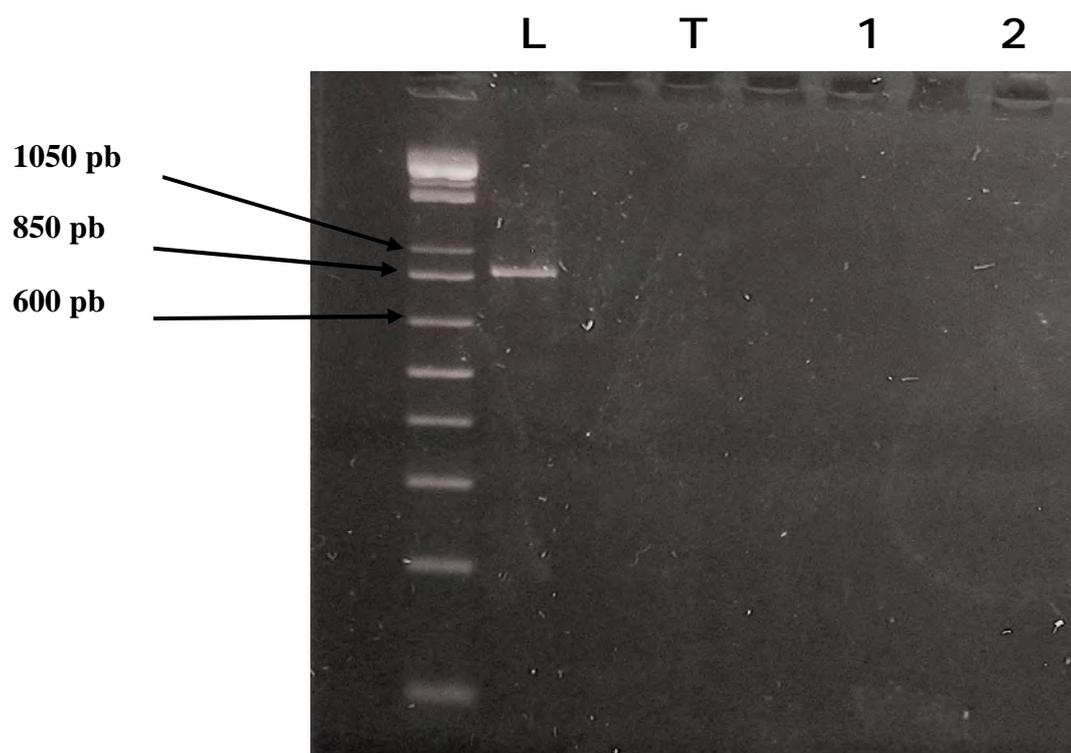


Figure 7 : Migration sur gel d'agarose des produits du génotypage SHV.

L est le marqueur de poids moléculaire et T le témoin SHV positif. Les produits de l'amplification des souches à analyser ont été déposés dans les puits 1 à 6.

2. ÉTUDE DES ACTIVITÉS ANTIBACTÉRIENNES DE 38 ESPÈCES VÉGÉTALES SUR DES SOUCHES DE *E. COLI* PRODUCTRICES DE BÊTA-LACTAMASES

La Figure 8 récapitule le protocole suivi au cours de cette étude et résume les résultats obtenus.

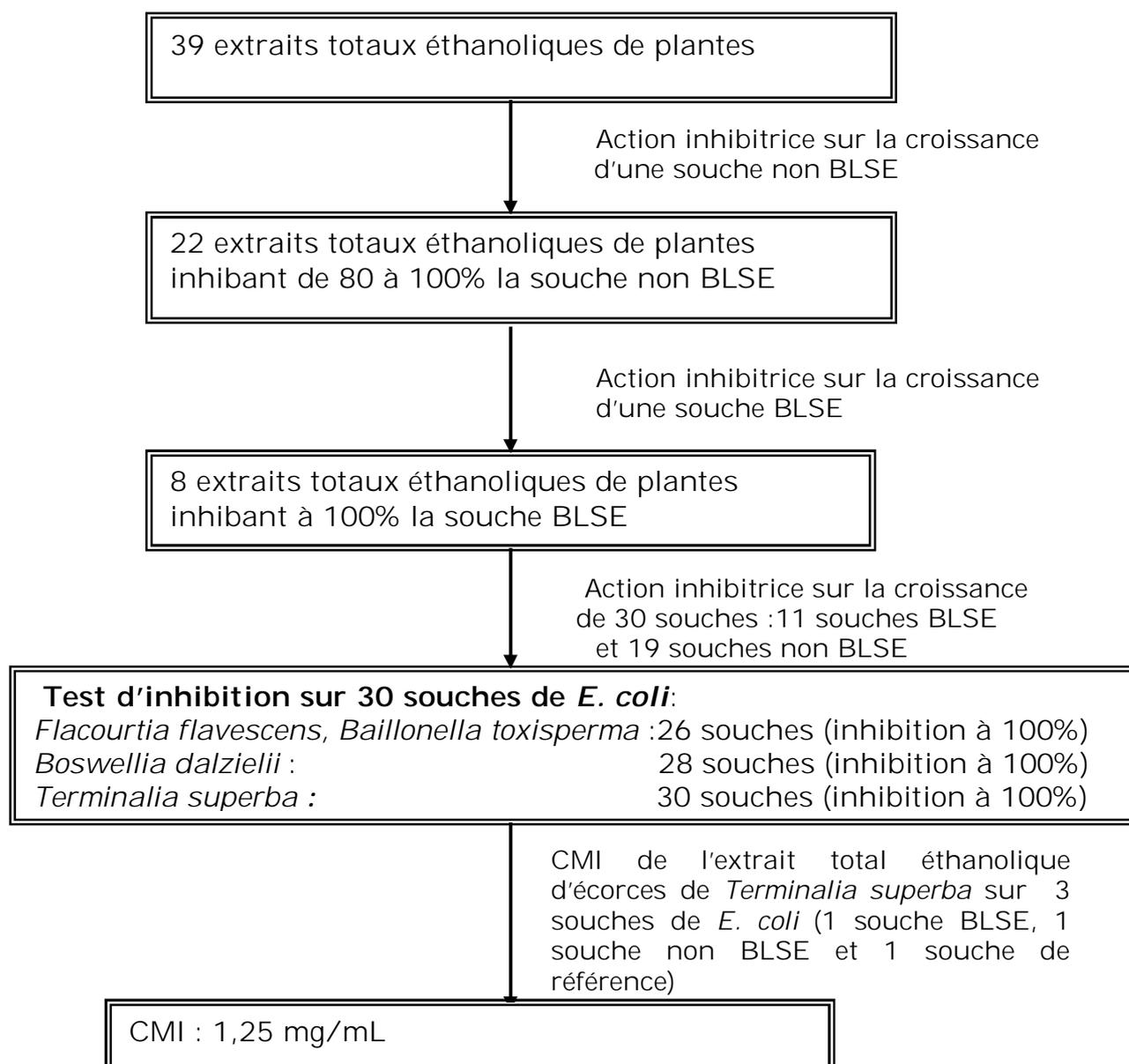


Figure 8 : Activités antibactériennes de 39 extraits totaux éthanoliques sur des souches de *E. coli* productrices de bêta-lactamase

2.1. Inhibition de la croissance d'une souche de *E. coli* non BLSE de type TEM

La souche de *E. coli* non BLSE de type TEM est résistante à l'amoxicilline, à la doxycycline et à la nétilmycine ; elle a une sensibilité intermédiaire pour la gentamycine et la minocycline ; elle est sensible à l'amoxicilline +acide clavulanique, la céfalotine, la céfazoline, l'aztréonam, la ceftriaxone, la céfotaxime, l'imipénème, l'ofloxacine et l'acide nalidixique.

Trente-neuf extraits totaux éthanoliques obtenus à partir de 38 espèces végétales sont testés sur cette souche. À l'issue des résultats de l'inhibition de la croissance de cette souche, les extraits totaux éthanoliques sont répartis en trois groupes (Tableaux IVa à IVc) correspondant aux pourcentages d'inhibition suivants : 0%, de 55 à 91% et 100%.

Tableau IVa: Absence d'inhibition (0%) de la croissance de la souche de *E. coli* non BLSE

Espèces végétales	Famille	Organe utilisé	Pourcentage d'inhibition
<i>Aloe barteri</i>	Aloeaceae	Feuilles	0%
<i>Alstonia boonei</i>	Apocynaceae	Feuilles, écorces	0%
<i>Annona senegalensis</i>	Annonaceae	Feuilles	0%
<i>Caloncoba welwitschii</i>	Flacourtiaceae	Ecorces	0%
<i>Hexalobus crispiflorus</i>	Annonaceae	Ecorces	0%
<i>Ipomoea batatas</i>	Convolvovulaceae	Feuilles	0%
<i>Rytiginia canthioides</i>	Rubiaceae	Feuilles	0%
<i>Trema orientalis</i>	Ulmaceae	Feuilles	0%

On remarque que 8 extraits (21%) n'ont aucune action inhibitrice sur la croissance de la souche de *Escherichia coli* testée (Tableau IVa).

Tableau IVb : Inhibition de 55 à 91% de la croissance de la souche de *E. coli* non BLSE

Espèces végétales	Famille	Organe utilisé	Pourcentage d'inhibition
<i>Tylophyra africana</i>	Asclepiadaceae	Tiges, feuilles	55%
<i>Klainedoxa gabonensis</i>	Simaroubaceae	Ecorces	57%
<i>Ficus platyphylla</i>	Moraceae	Ecorces, tiges et feuilles	62%
<i>Cnestis ferruginea</i>	Connaraceae	Feuilles	66%
<i>Dacryodes edulis</i>	Burceraceae	Ecorces	66%
<i>Irvingia gabonensis</i>	Simaroubaceae	Ecorces	66%
<i>Clausena anisata</i>	Rutaceae	Tiges, feuilles	67%
<i>Grewia Barteri</i>	Tiliaceae	Feuilles, racines	71%
<i>Portulaca oleracea</i>	Portulacaceae	Feuilles	71%
<i>Pachypodanthium staudtii</i>	Annonaceae	Ecorces	74%
<i>Canarium schweinfurthii</i>	Burceraceae	Ecorces	81%
<i>Psidium guajava</i>	Myrtaceae	Ecorces	83%
<i>Combretum collinum</i>	Combretaceae	Feuilles	84%
<i>Irvingia gabonensis</i>	Simaroubaceae	Ecorces	66%
<i>Ficus mucuso</i>	Moraceae	Ecorces	86%
<i>Musanga cecropioides</i>	Cecropiaceae	Ecorces	86%
<i>Kalanchoe crenata</i>	Crassulaceae	Feuilles	88%
<i>Persea americana</i>	Lauraceae	Feuilles, tiges, graines	88%
<i>Picralima nitida</i>	Apocynaceae	Ecorces	88%
<i>Bridelia ferruginea</i>	Euphorbiaceae	Feuilles	91%
<i>Mallotus oppositifolius</i>	Euphorbiaceae	Feuilles	91%

Le Tableau IVb regroupe 20 extraits totaux (51%) qui ont induit une inhibition partielle comprise entre 55 et 91% de la croissance de la souche de *E. coli* non BLSE. *Bridelia ferruginea* (Euphorbiaceae) et *Mallotus*

oppositifolius (Euphorbiaceae) exercent l'actrion inhibitrice la plus importante (91%) alors que *Tylophyra africana* (Asclepiadaceae) et *Klainedoxa gabonensis* (Simaroubaceae) montrent les plus faibles activités inhibitrices (55% et 57% respectivement) sur la souche testée.

Tableau IVc : Inhibition à 100% de la croissance de la souche de *E. coli* non BLSE

Espèces végétales	Famille	Organe utilisé	Pourcentage d'inhibition
<i>Baillonella toxisperma</i>	Sapotaceae	Ecorces	100%
<i>Boswellia dalzielii</i>	Burceraceae	Ecorces	100%
<i>Carapa procera</i>	Meliaceae	Fruits	100%
<i>Ceiba pentandra</i>	Bombacaceae	Ecorces	100%
<i>Enantia chloranta</i>	Annonaceae	Ecorces	100%
<i>Ficus exasperata</i>	Moraceae	Feuilles, tiges et écorces	100%
<i>Flacourtia flavescens</i>	Flacourtiaceae	Feuilles	100%
<i>Piptadeniastrum africanum</i>	Mimosaceae	Ecorces	100%
<i>Terminalia superba</i>	Combretaceae	Ecorces	100%
<i>Voacanga africana</i>	Apocynaceae	Ecorces	100%
<i>Voacanga africana</i>	Apocynaceae	Graines	100%

Onze extraits (28%) dont *Terminalia superba* (Combretaceae) inhibent à 100% la croissance de cette souche (Tableau IVc).

2.2. Inhibition de la croissance d'une souche de *E. coli* productrice de BLSE de type TEM

Les vingt deux extraits totaux éthanoliques qui inhibent de 80 à 100% la souche non BLSE sont testés sur une souche de *Escherichia coli* multirésistante aux antibiotiques commercialisés, productrice de BLSE de

type TEM. Cette souche est résistante aux antibiotiques suivants : amoxicilline, amoxicilline +acide clavulanique, céfalotine, céfazoline, aztréonam, ceftriaxone, céfotaxime, imipénème, doxycycline, minocycline, ciprofloxacine, ofloxacine, acide nalidixique, acide pipémidique, nétilmycine, gentamycine et sulfaméthoxazole-triméthoprime sur la base de l'antibiogramme réalisé sur milieu gélosé. Elle a une sensibilité intermédiaire pour la nitroxoline et l'amikacine; elle est sensible au chloramphénicol.

La croissance de cette souche est inhibée à 100% par *Voacanga africana*, *Boswellia dalzielii*, *Baillonella toxisperma*, *Flacourtia flavescens*, *Canarium schweinfurthii*, *Psidium guajava* et *Terminalia superba*. Cinq extraits de plante n'exercent aucune inhibition sur la croissance de cette souche (*Ficus exasperata*, *Kalanchoe crenata*, *Musanga cecropioides*, *Persea americana*, *Picralima nitida*). L'inhibition exercée par les autres extraits de plante varie entre 11 et 81% (Tableau V).

Tableau V : Inhibition de la croissance d'une souche BLSE de type TEM par les extraits totaux éthanoliques

Espèces végétales	Famille	Organe utilisé	Pourcentage d'inhibition
<i>Baillonella toxisperma</i>	Sapotaceae	Ecorces	100%
<i>Boswellia dalzielii</i>	Burceraceae	Ecorces	100%
<i>Canarium schweinfurthii</i>	Burceraceae	Ecorces	100%
<i>Flacourtia flavescens</i>	Flacourtiaceae	Feuilles	100%
<i>Psidium guajava</i>	Myrtaceae	Ecorces	100%
<i>Terminalia superba</i>	Combretaceae	Ecorces	100%
<i>Voacanga africana</i>	Apocynaceae	Ecorces	100%
<i>Voacanga africana</i>	Apocynaceae	Graines	100%
<i>Piptadeniastrum africanum</i>	Mimosaceae	Ecorces	81%
<i>Bridelia ferruginea</i>	Euphorbiacea	Feuilles	68%
<i>Enantia chloranta</i>	Annonaceae	Ecorces	66%

<i>Ficus mucoso</i>	Moraceae	Ecorces	60%
<i>Carapa procera</i>	Meliaceae	Fruits	55%
<i>Irvingia gabonensis</i>	Simaroubaceae	Ecorces	44%
<i>Ceiba pentandra</i>	Bombacaceae	Ecorces	39%
<i>Combretum collinum</i>	Combretaceae	Feuilles	13%
<i>Mallotus oppositifolius</i>	Euphorbiaceae	Feuilles	11%
<i>Ficus exasperata</i>	Moraceae	Feuilles	0%
<i>Kalanchoe crenata</i>	Crassulaceae	Feuilles	0%
<i>Musanga cecropioides</i>	Cecropiaceae	Ecorces	0%
<i>Persea americana</i>	Lauraceae	Feuilles, tiges, graines	0%
<i>Picralima nitida</i>	Apocynaceae	Ecorces	0%

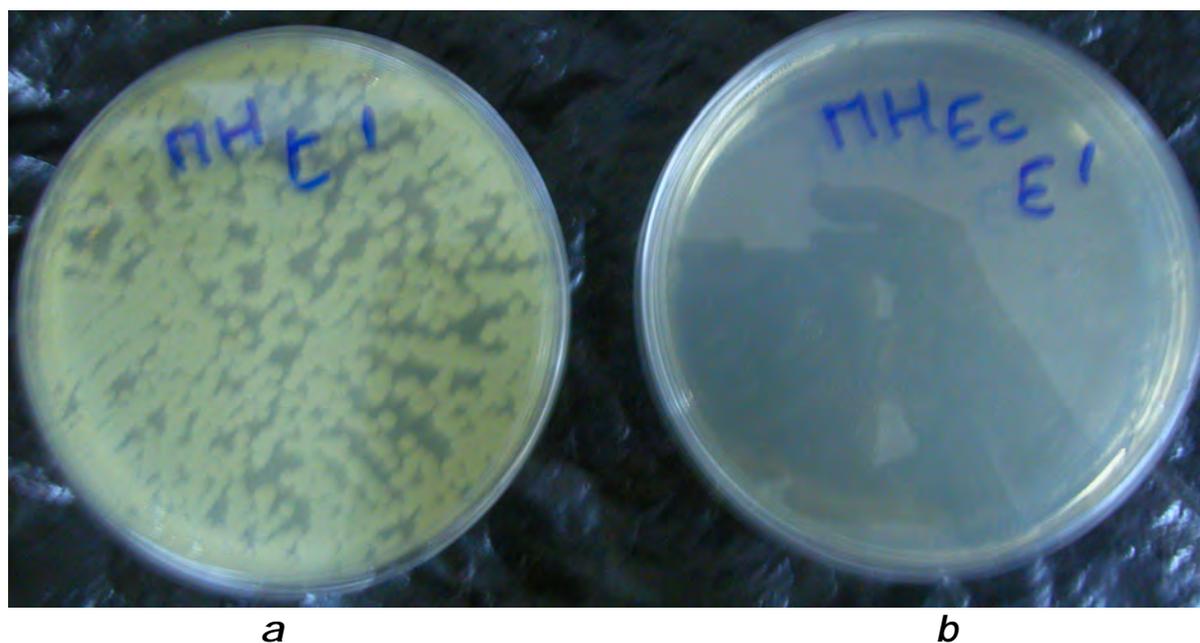


Figure 9 : Inhibition de la souche BLSE de type TEM par l'extrait éthanolique des écorces de *Terminalia superba*.

a- Culture en absence de *Terminalia superba*. b- Culture après inhibition par *Terminalia superba*.

La Figure 9 montre un exemple de l'inhibition à 100% de la croissance de cette souche par les extraits totaux éthanoliques des écorces de *Terminalia superba* à la concentration de 100 mg/mL dans le milieu réactionnel.

2.3. Inhibition de la croissance de 30 souches productrices de bêta-lactamases par les extraits totaux de 4 espèces végétales

Tableau VI : Activités antibactériennes des extraits éthanoliques de 4 espèces végétales sur trente souches productrices de bêta-lactamases

% d'inhibition de la croissance des souches	Nombre de souches de <i>E. coli</i> inhibées			
	<i>Baillonella toxisperma</i>	<i>Boswellia dalzielii</i>	<i>Flacourtia Flavescens</i>	<i>Terminalia superba</i>
100%	26	28	26	30
92%	2			
86%			1	
77%		1	1	
64%	1			
63%		1		
52%			1	
38%	1			
13%			1	

Parmi les 8 extraits de plantes qui inhibent à 100% la croissance de la souche productrice de BLSE, 4 extraits ont été retenus en vue de la détermination de leur spectre d'action antibactérienne sur un plus grand nombre de souches productrices de bêta-lactamases.

Ainsi, les pourcentages d'inhibition de la croissance de 11 souches productrices de BLSE et de 19 souches non-BLSE sont déterminés avec les extraits totaux éthanoliques à la concentration de 100 mg/mL dans le milieu.

Les écorces de *Boswellia dalzielii* inhibent à 100% la croissance de 28 souches de *E. coli* productrices de bêta-lactamases. Deux souches sont inhibées partiellement à 77 et 63%. Le nombre de souches inhibées totalement est de 26 souches pour les feuilles de *Flacourtia flavescens* et les écorces de *Baillonella toxisperma*. Les feuilles de *Flacourtia flavescens* inhibent partiellement 4 souches de *E. coli* respectivement à 86, 77, 52 et 13%. Les écorces de *Terminalia superba* inhibent à 100% la croissance des 30 souches productrices de bêta-lactamases (Tableau VI).

2.4. Détermination de la CMI d'extraits totaux éthanoliques d'écorces de *Boswellia dalzielii* et de *Terminalia superba* sur trois souches de *E. coli*

La CMI est déterminée sur les deux souches de *E. coli* productrices de bêta-lactamase qui ont servi à la détermination de l'activité antibactérienne de 38 espèces végétales de la pharmacopée africaine (une souche productrice de BLSE et une souche non BLSE. La souche de référence *E. coli* ATCC 25922 a été également testée. La CMI des extraits totaux éthanoliques de *Boswellia dalzielii* est de 10 mg/mL pour les deux souches productrices de bêta-lactamase et de 6 mg/mL pour la souche de référence. *Terminalia superba* a la même CMI de 1,25 mg/mL pour les trois souches testées (Tableau VII).

Tableau VII : CMI de *Boswellia dalzielii* et de *Terminalia superba* sur trois souches de *E. coli*

Souches	Souche de	Souche	Souche
Espèces végétales	référence	non-BLSE	BLSE
<i>Boswellia dalzielii</i>	6 mg/mL	10 mg/mL	10 mg/mL
<i>Terminalia superba</i>	1,25 mg/mL	1,25 mg/mL	1,25 mg/mL

3. CRIBLAGE PHYTOCHIMIQUE DES EXTRAITS TOTAUX ETHANOLIQUES INHIBANT À 100% LA CROISSANCE DE LA SOUCHE BLSE

Des extraits totaux éthanoliques d'organes de 6 espèces végétales parmi les 7 ayant inhibé à 100% la croissance de la souche de *Escherichia coli* productrice de BLSE sont réalisés afin de déterminer les principales classes de composés phytochimiques qu'ils contiennent.

3.1. Rendement des extraits totaux éthanoliques

Les plus faibles rendements concernent les écorces de *Canarium schweinfurthii* et les racines de *Terminalia superba*. Les extraits d'écorces de *Terminalia superba*, *Voacanga africana* et *Boswellia dalzielii* ont les rendements les plus élevés (TableauVIII).

Tableau VIII: Rendement des extractions éthanoliques de 6 espèces végétales inhibitrices de la croissance de la souche BLSE

Espèce Végétale	Organe	Rendement (%)
<i>Terminalia superba</i>	Ecorces	14,4
<i>Terminalia superba</i>	Racines	4
<i>Terminalia superba</i>	Feuilles	7
<i>Voacanga africana</i>	Ecorces	12,3
<i>Voacanga africana</i>	Graines	6,14
<i>Boswellia dalzielii</i>	Ecorces	14
<i>Flacourtia flavescens</i>	Feuilles	12
<i>Canarium schweinfurthii</i>	Ecorces	3,2
<i>Psidium guajava</i>	Ecorces	14,1

3.2 Détermination des principales classes de composés phytochimiques

Aucun des organes de plantes analysés ne contient de stéroïdes et triterpénoïdes, ni de dérivés cyanogénétiques, ni de composés réducteurs. Par ailleurs, les dérivés quinoniques n'ont été détectés dans aucun organe de plante (Tableau IX). Les trois organes (feuilles, écorces et racines) de *Terminalia superba* contiennent des dérivés anthracéniques sous forme libre à la différence des autres espèces végétales analysées. On note également la présence de coumarines et de mucilages dans les écorces et les racines de *Terminalia superba*. On trouve également des composés coumariques dans les organes d'autres espèces (graines de *Voacanga africana*, feuilles de *Flacourtia flavescens* et écorces de *Psidium guajava* et de *Boswellia dalzielii*).

Les tanins catéchiques sont présents dans tous les extraits analysés. Les tanins galliques ont été mis en évidence dans les organes de *Terminalia superba* ainsi que dans les écorces de *Voacanga africana*. Les écorces et les graines de *Voacanga africana* contiennent des alcaloïdes.

Tableau IX: Principaux composés phytochimiques des 7 extraits inhibiteurs de la croissance de la souche productrice de BLSE

Espèce végétale Organe Composé	<i>Terminalia</i>	<i>Terminalia</i>	<i>Terminalia</i>	<i>Voacanga</i>	<i>Voacanga</i>	<i>Flacourtia</i>	<i>Boswellia</i>	<i>Cannarium</i>	<i>Psidium</i>
	<i>superba</i>	<i>superba</i>	<i>superba</i>	<i>africana</i>	<i>africana</i>	<i>flavescens</i>	<i>dalzielii</i>	<i>Schweinfurthii</i>	<i>guajava</i>
	Ecorces	Feuilles	Racines	Ecorces	Graines	Feuilles	Ecorces	Ecorces	Ecorces
Alcaloïdes	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Tanins galliques	+	+	Traces	+	-	-	-	-	-
Tanins catéchiques	++	+	+	+	Traces	++	+++	++	+++
Flavonoïdes	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Anthocyanes	+	-	-	-	-	+	-	-	-
Leucoanthocyanes	+	-	-	-	-	+	+	+	+
Quinones	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Anthracéniques	++	+	+	-	-	-	-	-	-
Stéroïdes et triterpénoïdes	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dérivés cyanogénétiques	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mucilages	++	++	-	-	+	+	Traces	-	++
Cardénolides	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Saponosides	+	-	-	+	-	-	-	+	-
Coumarines	+	-	+	-	+	+	+	-	+
Composés réducteurs	-	-	-	-	-	-	-	-	-

-: absence du composé. + : faible quantité. ++ : abondant.+++ : très abondant.

CHAPITRE 3 :

DISCUSSION

Caractérisation des souches de *Escherichia coli*

Plusieurs critères jouent en faveur du choix de *E. coli* comme matériel biologique d'étude. En effet, *E. coli* est le germe le plus fréquemment isolé au cours de diverses infections chez l'Homme avec une prévalence de 70% dans les infections urinaires [Eyquem *et al*, 2000]. Cette espèce bactérienne, composante constante de la flore intestinale chez l'Homme est également un modèle de laboratoire qui a fait l'objet de nombreuses études en physiologie et en biologie moléculaire [Donnenberg, 2002; Escobar-Paramo *et al*, 2004].

La détection des bêta-lactamases, basée sur le test acidimétrique en tubes en milieu liquide de Syre [1981] décrit par Courvallin [1985], a révélé 74 souches productrices de bêta-lactamases, soit 91,3% des souches résistantes aux bêta-lactamines. La production de bêta-lactamases constitue donc le principal mécanisme de résistance aux bêta-lactamines. Ainsi 8,7% des souches exercent une résistance aux bêta-lactamines par d'autres mécanismes évoqués par Berche, en l'occurrence la modification des PLP ou l'imperméabilité de la paroi bactérienne [Berche *et al*, 1989].

La recherche spécifique des BLSE par la méthode modifiée du double disque de Jarlier *et al* [1988] a permis d'identifier 11 souches productrices de BLSE, soit 14,8% des souches productrices de bêta-lactamases correspondant à 12,6% des souches isolées des infections urinaires. Une étude réalisée dans le même contexte (infections urinaires chez des patients en traitement ambulatoire) en Espagne, a montré que 1,4% des souches de *E. coli* isolées sont productrices de BLSE [Rodriguez-Bano *et al*, 2004]. Cette prévalence est de 5,7% dans une étude réalisée à Londres en Angleterre [Bean *et al*, 2008]; elle est de 34,42% dans une étude réalisée à Aligarh en Inde [Akram *et al*, 2007] et 29,1% à Dehli, Inde [Kothari *et al*, 2008].

Ces données de la littérature semblent révéler une forte prévalence dans les pays en voie de développement qui pourrait être due à un faible contrôle de la consommation des produits pharmaceutiques. Ces résultats sont probablement l'illustration d'un autre mécanisme évoqué concernant l'extension des souches productrices de BLSE : le "stress antibiotique" [Yu *et*

al, 2002]. Dans notre contexte sous-régional, la cause principale de ce "stress antibiotique" subi par les germes au fil des infections diverses est l'automédication.

Nous avons comparé nos données (relatives à la prévalence des souches de *E. coli* productrices de BLSE) à celles de la littérature dans un contexte d'infections urinaires à *E. coli* d'origine strictement nosocomiales. Ainsi, dans une unité de pédiatrie à Gdansk en Pologne, la prévalence est de 13,2% [Delinska-Galinska *et al*, 2006]. Une étude réalisée dans un centre hospitalier à l'est de Londres en Angleterre montre une prévalence de 21,6% [Bean D. *et al*, 2008]. Olonitola *et al* [2007] rapportent que 27,3% des souches de *E. coli* d'origine nosocomiale à Zaria au Nigéria sont productrices de BLSE.

Les bactéries porteuses de gènes de bêta-lactamases à spectre élargi rencontrées souvent dans un contexte hospitalier s'étendent de plus en plus aux infections extrahospitalières par la combinaison de plusieurs facteurs tels que : une infection bactérienne récidivante, un traitement antibiotique aux céphalosporines, une hospitalisation dans les douze mois précédant l'infection [Dromigny *et al*, 2005; Calbo *et al*, 2006].

La plupart des travaux montrent une augmentation des infections dues aux germes BLSE, même dans les régions du monde où leur prévalence demeure relativement faible : de 0,1% en Nouvelle-Zélande en 2000, elle est passée à 0,7% en 2006 [Heffernan *et al*, 2006]. Calbo *et al* [2006] ont montré que les infections urinaires provoquées par les souches de *E. coli* productrices de BLSE à Barcelone en Espagne constituent 0,47% des souches isolées en 2000 et 1,7% en 2003.

Plusieurs schémas ont été proposés pour la mise en évidence des souches productrices de BLSE par la méthode microbiologique des doubles disques suivant les distances préconisées entre le disque contenant l'acide clavulanique et les disques de céphalosporines (1,5 cm à 3 cm selon les auteurs) [Jarlier *et al*, 1988; Pagani *et al*, 2003; Morris *et al*, 2003; Gangoué-Piéboji *et al*, 2005].

La distance la plus judicieuse est celle qui assure une diffusion suffisante de l'acide clavulanique pour couvrir partiellement la zone de diffusion de la céphalosporine. Nous avons retenu la distance de 2 cm pour la détection des BLSE car elle nous a permis de mieux distinguer le diamètre d'inhibition dû à l'AMC seule, celui de la céphalosporine testée et l'augmentation du diamètre d'inhibition due à l'action synergique de l'acide clavulanique.

Le profil de résistance des souches de *E. coli* aux antibiotiques testés révèle une hétérogénéité des souches isolées. Les souches productrices de BLSE testées dans notre étude montrent une bonne sensibilité à l'imipénème : 9% de résistance correspondant à une souche sur 11. Ce résultat est en accord avec celui de Cao *et al* au Vietnam [2002) qui a observé 5,6% de résistance à l'imipénème. D'autres auteurs ont signalé 0% de souches résistantes à l'imipénème [Rodriguez-Bano *et al*, 2003; Luzzaro *et al*, 2006].

L'analyse du profil de résistance montre une sensibilité relativement importante des souches de *E. coli* productrices de BLSE aux fluoroquinolones (ciprofloxacine et ofloxacine) et à la gentamycine (aminoside) puisque la résistance à ces antibiotiques est inférieure à 28%. Des auteurs ont obtenu des résultats comparables pour les fluoroquinolones, confirmant l'activité à large spectre de ces antibiotiques [Blomberg *et al*, 2005; Korten *et al*, 2007].

Cependant, une étude réalisée par notre équipe sur un échantillon prélevé dans un centre hospitalier révèle une résistance nettement plus élevée aux fluoroquinolones des souches de *E. coli* productrices de BLSE (48%) [Ahoyo *et al*, 2007]. D'autres auteurs [Rodriguez-Bano *et al*, 2004; Luzzaro *et al*, 2006] ont signalé des taux de résistance plus élevés. Ces résultats traduisent la grande variabilité de la sensibilité des souches aux fluoroquinolones.

Par contre les souches de *E. coli* productrices de BLSE sont très peu sensibles à l'amoxicilline et à la triméthoprim-sulfaméthoxazole en accord

avec les résultats de Ahoyo et ceux de Briggs [Briggs *et al*, 2005; Ahoyo *et al*, 2007].

A l'instar des souches de *E. coli* productrices de BLSE, les souches non BLSE dans notre étude exercent une très grande résistance à l'amoxicilline et à la triméthoprime-sulfaméthoxazole. Ces résultats confirment ceux de Ndugulile [2005] et de Kothari [2008].

On note une différence significative des pourcentages de résistance des souches non BLSE et BLSE aux céphalosporines de troisième génération et à l'aztréonam ($p < 0,05$). Par contre, la différence entre la fréquence de résistance des souches BLSE et non BLSE aux cyclines, quinolones, aminosides et sulfamides testés n'est pas significative.

Au regard de ces résultats, le recours au laboratoire de bactériologie pour le dépistage du phénotype BLSE et du phénotype de résistance aux antibiotiques des germes isolés des infections s'impose. Dans la situation extrême d'un traitement empirique, il est nécessaire d'éviter certains antibiotiques tels que l'amoxicilline et la triméthoprime-sulfaméthoxazole, du reste largement utilisés en automédication. Dans ce contexte, la prescription des antibiotiques à large spectre (quinolones essentiellement) ne pourra se faire qu'avec prudence.

Dans la littérature, il existe très peu de données sur la caractérisation génétique des BLSE en Afrique. Des souches de *Klebsiella pneumoniae* porteuses du gène de CTX-M-12 ont été signalées au Kenya, de gènes codant pour TEM-53, TEM-63, SHV-2, SHV-5, SHV-19, SHV-20, SHV-21 et SHV-22 en Afrique du Sud, ceux de CTX-M 15 et SHV-12 en Tanzanie. Le gène de SHV-12 a été retrouvé dans des souches de *Salmonella enterica* serotype *Babelsberg* et *Enteridis* chez des enfants maliens [Ndugulile *et al*, 2005] et au Cameroun dans des souches de *E. coli* provenant d'infections nosocomiales [Gangoué-Piéboji *et al*, 2005].

Toutes les souches de *E. coli* productrices de BLSE analysées dans notre étude possèdent des gènes de bêta-lactamases de type TEM. Aucun gène de type SHV ni de type CTX-M n'a été détecté chez les souches

analysées. Des travaux réalisés sur des infections urinaires d'origine non-hospitalière à *E. coli* ont donné des résultats différents.

En effet, Rodriguez-Bano [2003] signale la présence de gènes de type CTX-M-9 chez 64% des souches productrices de BLSE, tandis que les groupes SHV et TEM sont représentés chacun à 18%. Les données de Calbo *et al* [2006] révèlent une prédominance du type TEM : 60% des souches BLSE sont de type TEM, 24% de type CTX-M et 16% de type SHV. La faible taille de notre échantillon devrait être considérée dans cette comparaison des données. Cependant, la présence de souches productrices de BLSE dans ce contexte d'infections extrahospitalières chez des femmes gestantes est assez préoccupante. Une étude plus élargie et approfondie devrait être réalisée afin d'évaluer la prévalence des différents types de BLSE. Ainsi des recommandations pour une antibiothérapie efficace pourraient être faites.

L'absence de gènes SHV au cours de l'analyse PCR chez les souches productrices de BLSE peut s'expliquer par leur origine non-nosocomiale. En effet, en milieu hospitalier, la transmission horizontale est favorisée par la proximité de plusieurs souches pathogènes qui permet l'acquisition des gènes de type SHV par les souches de *E. coli*.

Par ailleurs, les résultats des tests phénotypiques de détection de BLSE n'indiquent pas la présence d'enzyme de type CTX-M, (groupe caractérisé par l'hydrolyse préférentielle de la céfotaxime), chez les souches analysées. Ce qui a été confirmé par les résultats de la PCR. La littérature indique que les gènes de type CTX-M isolés de germes d'origine non-hospitalière proviennent principalement d'infections diarrhéiques [Paterson D. L. *et al*, 2005].

L'analyse de 19 souches non-BLSE a révélé la présence de gènes de type TEM. Ces résultats sont en concordance avec les données de la littérature. En effet, moins de 10% des souches de *E. coli* non BLSE sont porteuses du gène SHV1 [Paterson *et al*, 2005]. Nous pouvons supposer la présence du gène TEM1 chez la majorité des souches non BLSE analysées puisqu'il est le gène non-BLSE le plus répandu chez *E. coli* [Livermore,

1995; Fluit *et al* , 2001; Bert *et al*, 2005]. Ces données sont confortées par celles issues des travaux de Zeba *et al* [2007] qui ont montré que le gène TEM1 est à la base de la résistance aux pénicillines de souches de *E. coli* non BLSE issues d'infections diverses au Burkina-Faso.

Activités antibactériennes des espèces végétales étudiées

Concernant les extraits de plantes qui n'ont pas inhibé la croissance de la souche de *E. coli* non BLSE, nos résultats montrent que l'extrait éthanolique des feuilles de *Annona senegalensis* n'inhibe pas la croissance de *E. coli*. Ces données se rapprochent des travaux de Apak *et al* pays [2006] qui n'ont pas détecté d'effets antibactériens des extraits aqueux et méthanoliques des racines de cette plante sur une souche sauvage de *E. coli*.

En concordance avec nos résultats, Adomi au Nigéria [2006] rapporte que l'extrait éthanolique des écorces de *Alstonia boonei* n'a pas d'action sur la croissance de bactéries Gram négatif d'origine clinique. Cependant, l'extrait aqueux inhibe leur croissance. Les travaux de Olanlokun au Nigéria [2007] révèlent également une activité antibactérienne de cette plante sur *E. coli*. En effet, les fractions cyclohexanique, chloroformique et aqueuse réalisées à partir de l'extrait méthanolique ont révélé une activité antibactérienne sur *E. coli*. Mais l'extrait issu du fractionnement par l'acétate d'éthyle n'inhibe pas la croissance de *E. coli*.

D'autres auteurs rapportent des effets antibactériens des extraits de plante de ce groupe sur des souches de *E. coli* ou sur d'autres bactéries à Gram négatif. Ainsi les travaux de Djikpo-Tchibozo au Bénin [2004] ont montré un effet antibactérien des extraits aqueux et hydroéthanolique de *Rytiginia canthioides* sur une souche sauvage de *E. coli*. Des propriétés antibactériennes sur des bactéries Gram négatifs y compris *Escherichia coli* ont été détectées dans les extraits méthanoliques et d'acétate d'éthyle des racines de *Trema orientalis*. L'extrait cyclohexanique s'est révélé sans effet sur la croissance de *E. coli* [Chowdhury *et al*, 2006].

Ces résultats, différents des nôtres, peuvent s'expliquer par le fait que les souches cliniques isolées d'infections possèdent une susceptibilité variable par rapport à différents antibiotiques ou principes actifs. Par ailleurs, le test antibactérien est généralement effectué sur des souches sauvages de référence, supposées plus sensibles aux principes actifs que les souches isolées au cours de diverses infections. Enfin la composition qualitative et quantitative en principes actifs de ces espèces végétales peut connaître des variations liées aux contextes géoclimatiques.

Parmi les espèces végétales qui ont exercé une inhibition partielle sur la croissance de la souche de *E. coli* non BLSE, certaines ont fait l'objet d'études sur leur activité antibactérienne; mais d'autres propriétés ont été également explorées.

En concordance avec nos résultats, des études ont révélé les propriétés antibactériennes de *Bridelia ferruginea* sur plusieurs bactéries dont *Escherichia coli*. L'extrait méthanolique du fruit, de même que les extraits méthanolique, cyclohexanique et d'acétate d'éthyle des feuilles révèlent les propriétés antibactériennes de cette plante [Akinpelu *et al*, 2000; Talla *et al*, 2002].

Des travaux confirment nos résultats relatifs à l'activité antibactérienne vis-à-vis de *E. coli* de *Clausena anisata* [van Vuuren *et al*, 2003 ; Ndukwe *et al*, 2005], *Cnestis ferruginea* et *Ficus platyphylla* [Ndukwe *et al*, 2005]. La littérature signale une activité antibactérienne et antitumorale de *Klainedoxa gabonensis* [Ekouya *et al*, 2006]. Des activités antibactérienne et antifongique ont été mises en évidence dans des extraits de *Portulaca oleracea* [Bae, 2004 ; Elkhayat *et al*, 2008]. Les travaux de Fakeye *et al* [2000] réalisés sur les extraits méthanoliques d'écorces et ceux de Nkere *et al*, [2005] réalisés sur les extraits éthanoliques du même organe de *Picralima nitida* ainsi que les tests de Kuete *et al*, [2007] utilisant les extraits méthanoliques d'écorces de *Irvingia gabonensis* confirment nos résultats concernant l'inhibition de la croissance de *E. coli*.

Les propriétés antibactériennes des feuilles de *Kalanchoe crenata* ont été mises en évidence par d'autres auteurs notamment sur la souche ATCC

25922 de *E. coli*. Les extraits réalisés à partir de l'eau, du méthanol et du vin de palme ont été utilisés. [Akinsulire *et al*, 2007]. Beaucoup d'auteurs rapportent l'utilisation ethnopharmacologique de *Ipomoea batatas*. Une protéine à activité antimicrobienne a été isolée des racines de cette plante [Huang *et al*, 2008]. Laine *et al* [1985] ont rapporté les propriétés antifongiques des extraits d'écorces de *Caloncoba welwitschii*. En outre, en concordance avec nos résultats, des études ont révélé les propriétés antibactériennes de *Combretum collinum* [Ramurafhi, 2007] et de *Persea americana* [Rivera de Leon *et al*, 2001].

Chukwujekwu *et al* [2005] ont montré l'efficacité de l'extrait au dichlorométhane des racines de *Mallotus oppositifolius* sur *E. coli* ainsi que d'autres bactéries couramment rencontrées dans les pathologies. Les tests de Adenkule *et al* [2006] comme les nôtres ont été réalisés avec des extraits de feuilles de cette plante. Leurs résultats montrent une activité antifongique des extraits aqueux et éthanoliques. En concordance avec nos résultats, et à la différence de ceux de Rabe *et al* [1997], Rivera de Leon *et al* [2001] rapportent une activité antibactérienne de *Psidium guajava* sur *E. coli*. Deux principes actifs isolés de l'extrait méthanolique de feuilles de *Psidium guajava* ont des propriétés antibactériennes sur *Salmonella enteridis* et *Bacillus cereus* [Dano *et al*, 2004].

D'autres propriétés ont été recherchées chez les espèces végétales qui ont inhibé partiellement la souche de *E. coli* non BLSE : activité antiplasmodiale chez *Hexalobus crispiflorus* [Boyom *et al*, 2003], activité antihelminthique de *Aloe barteri* [Ibrahim *et al*, 1984]. Des travaux ont été réalisés sur les propriétés analgésiques, anti-inflammatoires et antidiabétiques de *Canarium schweinfurthii* [Koudou J. *et al*, 2005; Kamtchouing *et al*, 2006]. On trouve une littérature abondante sur l'huile comestible extraite des graines de cette plante. Les travaux de Dongmo *et al* [2002] et ceux de Adeneye *et al* [2006] ont mis en évidence les propriétés antihypertensives des écorces de *Musanga cecropioides*.

Concernant les espèces végétales qui ont inhibé à 100% la croissance de la souche de *E. coli* non BLSE, la littérature signale un herbicide isolé de *Baillonella toxisperma* [Koshimizu *et al*, 1987]. Kubmarawa *et al* [2005] ont décelé une activité antibactérienne et antifongique de l'huile essentielle extraite des feuilles de *Boswellia dalzielii* sur des souches de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* et *Candida albicans*. Cependant, l'extrait aqueux n'a pas révélé d'action antibactérienne sur des souches cliniques de *E. coli* [Nwinyi *et al*, 2004].

Dès les années 50, on note un grand intérêt pour les alcaloïdes de *Voacanga africana* à cause des effets psychotropes de cette plante, propriété qui caractérise la plupart des Apocynacées. Les travaux de le Grand [1988] font état d'une forte activité antifongique de cette plante sur des souches d'*Aspergillus niger*. Contrairement à nos résultats, aucune activité antibactérienne n'a été décelée sur les bactéries à Gram négatif. Tona *et al* [1998 ; 1999] ont démontré les propriétés anti-diarrhéiques des racines de *Voacanga africana* avec une triple action anti-amibienne, antibactérienne et antispasmodique.

Les travaux de recherche sur les écorces de *Terminalia superba* concernent l'activité antiparasitaire sur le trypanosome, l'effet vasodilatateur, les propriétés antidiabétiques et l'action inhibitrice sur l' α -glucosidase [Adewunmi, *et al*, 2001; Dimo *et al*, 2006; Kamtchouing *et al*, 2006; Wansi, *et al*, 2007]. L'activité antibactérienne de *Flacourtia flavescens* a été également mis en évidence par les travaux de Djikpo-Tchibozo [2004].

Nos travaux réalisés sur les extraits des tiges, feuilles et écorces de *Ficus exasperata* ont révélé une activité antibactérienne. Cependant Macfoy *et al*, [1990] n'ont détecté aucune activité antibactérienne dans les extraits de feuilles de *Ficus exasperata*.

L'activité antibactérienne sur une souche de *E. coli* productrice de bêta-lactamase (non BLSE de type TEM), résistante également aux aminosides (gentamicine, nétylmicine) et aux cyclines (minocycline, doxycycline) a été retenue comme critère de sélection des extraits de plante

pour la poursuite des analyses. Il faut souligner que même les extraits qui se sont révélés inactifs sur cette souche pourraient inhiber la croissance d'autres souches de *E. coli*. En effet, ces extraits peuvent receler des composés phytochimiques exerçant leur action par un mécanisme autre que l'inhibition de la bêta-lactamase. Le but de nos travaux étant la recherche d'inhibiteurs de bêta-lactamases, il était judicieux de retenir, pour la suite des analyses, les extraits de plante ayant exercé une inhibition relativement forte sur la souche de *E. coli* productrice de bêta-lactamase.

La production d'une BLSE résulte d'une mutation et confère à l'espèce bactérienne en cause une résistance élargie à de nombreux principes actifs antibiotiques [Bradford P.A., 2001 ; Hyle E.P. *et al*, 2005]. La différence entre le nombre d'extraits de plantes inhibant à 100% la souche de *E. coli* non BLSE (11 extraits de plantes) et celle productrice de BLSE (8 extraits de plantes) suggère que les principes actifs responsables de ces effets exercent probablement une action directe sur une étape essentielle du métabolisme de ces souches. Il s'agirait alors d'une action réellement antibiotique et non d'un effet antiseptique non spécifique tel qu'il est défini dans la littérature [Berche *et al*, 1989]. En conséquence l'absence d'inhibition observée pour une partie des souches étudiées serait le reflet de l'existence d'un mécanisme de résistance à l'action antibiotique des extraits concernés. Ce mécanisme pourrait être la production de bêta-lactamases.

A cette étape, nous ne pourrions affirmer avec certitude que certaines espèces végétales à action antibactérienne étudiées recèlent de bêta-lactamines. Cependant, la présence de BLSE est susceptible d'étendre la résistance des germes en cause à des familles d'antibiotiques autres que les lactamines (les aminosides par exemple) [Paterson *et al* 2005]. Ceci vient conforter la thèse de l'existence de principes actifs antibiotiques au sein de ces espèces végétales.

Le choix des extraits totaux éthanoliques est justifié par le fait que l'éthanol a la propriété d'extraire la majeure partie des constituants phytochimiques. On constate une concordance de nos résultats avec ceux d'études effectuées sur les extraits méthanoliques. Notamment les travaux

de Apak [2006] sur *Annona senegalensis*, ceux de Fakeye [2000] réalisés sur *Picralima nitida* ou encore Akinpelu [2000] avec *Bridelia ferruginea* ainsi que Akinsulire [2007] sur *Kalanchoe crenata* ont montré que les extraits méthanoliques réalisés à partir des espèces végétales objet de notre étude présentaient le même profil d'inhibition de la croissance des souches de *E. coli* que celui que nous avons obtenu.

L'utilisation des extraits aqueux de *Flacourtia flavescens* par Djikpo-Tchibozo [2004], de *Kalanchoe crenata* par Akinsulire [2007] ou de *Bridelia ferruginea* par Akinpelu [2000] donnent des résultats comparables aux nôtres. Les extraits cyclohexaniques et d'acétate d'éthyle de *Bridelia ferruginea* par Talla [2002], donnent également des résultats similaires à ceux de nos extraits éthanoliques.

Étude phytochimique des espèces végétales étudiées

La littérature signale la présence d'alcaloïdes dans les écorces et graines de *Voacanga africana* [Renner 1959; Pegnyemb *et al*, 1999]. Selon Kerharo [1974] cette plante recèle également de tanins. Ces données confirment les résultats du criblage phytochimique. Contrairement à nos résultats, des flavonoides ont été décelés dans cette plante [Kerharo *et al*, 1974].

En concordance avec nos résultats, des tanins ont été isolés des écorces de *Psidium guajava* [Lopes M.G. *et al*, 1998]. Des alcaloïdes et des composés polyphénoliques ont été détectés dans cette plante contrairement à nos résultats [Ali *et al*, 1996; Lopes *et al*, 1998].

En accord avec nos résultats, Nwinyi *et al* [2004] signalent l'absence d'alcaloïdes, de dérivés anthracéniques et de saponines dans les extraits de *Boswellia dalzielii* et la présence de tanins.

Le criblage phytochimique est une étude préliminaire servant à orienter les fractionnements des extraits de plante. Cette méthode qualitative ne permet pas de détecter tous les composés présents dans un extrait, surtout ceux en très faibles quantités. Les méthodes chromatographiques en

phase gazeuse et à haute pression (HPLC) sont indiquées pour l'isolement et l'identification des composés phytochimiques.

Cependant une relation peut être établie entre les composés phytochimiques présents dans les extraits de plantes analysés et l'inhibition à 100% de la croissance de la souche de *E. coli* productrice de BLSE. Ainsi Rojas [2006] attribue aux alcaloïdes et anthocyanes de *Jaracanda mimosifolia* (Bignoniaceae) d'une part et aux anthocyanes de *Bixa orellana* (Bixaceae) d'autre part l'activité antibactérienne vis-à-vis de *E. coli*.

Les tanins isolés d'une préparation médicinale à partir de *Terminalia chebula*, *Terminalia belerica* (Combretaceae) et de *Phyllanthus embelica* (Euphorbiaceae) sont responsables de l'inhibition de la croissance de diverses bactéries pathogènes pour l'Homme, dont *Escherichia coli* [Biradar *et al* 2007]. Par ailleurs, des auteurs ont isolé et identifié des saponines, des flavonoïdes ainsi que des coumarines comme principes actifs conférant l'activité antibactérienne à des plantes médicinales [van der Watt *et al*, 2001; Shahverdi, *et al* 2005 ; Venkatesan *et al*, 2007].

Notre étude a révélé la présence de saponines dans l'extrait d'écorces de *Voacanga africana* de la famille des Apocynaceae. Venkatesan *et al*, [2007] a mentionné que l'activité antibactérienne des feuilles de *Gymnema sylvestre* (également de la famille des Apocynaceae) est due aux saponines. Les saponines pourraient donc être responsables de l'activité antibactérienne observée chez *Voacanga africana* dans notre étude. Les tanins mis en évidence dans les écorces, feuilles et racines de *Terminalia superba* pourraient être à l'origine de son activité antibactérienne à l'instar de *Terminalia chebula* et *Terminalia belerica*.

TROISIÈME PARTIE :

ÉTUDE BIOCHIMIQUE DES BÊTA-LACTAMASES EXTRAITES DE *ESCHERICHIA COLI* ET INHIBITION PAR LES EXTRAITS TOTAUX ÉTHANOLIQUES DE PLANTES

CHAPITRE 1 :

CADRE, MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. CADRE

Les tests d'inhibition par les extraits de plante ont été effectués au Laboratoire du Centre d'Information et de Recherche en Santé de la Reproduction (CIRSAR) sis à Cadjehoun, Cotonou. L'extraction des BLSE a été réalisée au Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire (LBBM) de la Faculté des Sciences et Techniques de l'Université d'Abomey-Calavi. L'isolement des bêta-lactamases et les déterminations du pH isoélectrique ont été réalisés au Laboratoire de Recherche en Biologie Appliquée de l'École Polytechnique d'Abomey-Calavi.

2. MATÉRIEL

- Les bêta-lactamases (BLSE et non BLSE) ont été extraites respectivement des deux souches de *E. coli* qui ont servi pour l'étude des propriétés antibactériennes de 38 espèces végétales de la pharmacopée africaine.

- Les extraits totaux éthanoliques de plantes utilisés sont ceux qui ont inhibé à 100% la croissance des deux souches de *E. coli*.

- Les mesures spectrophotométriques dans le visible ont été effectuées avec un appareil de type Screenmaster. Un spectrophotomètre GENESYS 6 a été utilisé pour les lectures dans l'UV.

3. MÉTHODES

3.1. Détermination de l'activité enzymatique des bêta-lactamases extraites des souches de *E. coli*

La mise au point de la détermination de l'activité bêta-lactamase a été réalisée avec l'extrait brut concentré de l'enzyme non BLSE de type TEM.

3.1.1. Extraction des bêta-lactamases et détermination qualitative de l'activité bêta-lactamase

Une suspension de la souche de *Escherichia coli* productrice de bêta-lactamase dans du bouillon Trypticase Soja a été centrifugée à 3000 RPM pendant 10 minutes. Le culot obtenu a été lavé trois fois dans de l'eau physiologique stérile, puis mis en suspension dans le tampon de lyse (tampon phosphate 10 mmol/L, EDTA 5 mmol/L, Triton X100 0,6% pH 8,0) et congelé à - 20° C.

Après deux séries de congélation et décongélation, les bactéries ont été soumises à un broyage par agitation dans du sable marin stérile. Le mélange a été centrifugé à 5000 tours par minute pendant 15 minutes. Le surnageant a été filtré sur une membrane de stérilisation (0,2 µm) puis soumis à un test de stérilité par ensemencement sur gélose et bouillon trypticase soja et coloration de Gram. De l'azide de sodium a été ajouté au surnageant à la concentration de 0,5% dans le milieu. L'extrait brut de bêta-lactamase a été soumis à une concentration sur cellule Amicon®. L'extrait brut concentré a subi à nouveau, après filtration sur membrane stérilisante un test de stérilité et a été congelé en vue de la détermination de l'activité bêta-lactamase.

La détermination qualitative de l'activité bêta-lactamase a été inspirée du test acidimétrique en tube de Syre [1981].

On a mélangé dans un tube :

Extrait brut de bêta-lactamase	500 µL
Substrat-réactif	150 µL

Le substrat-réactif a été préparé extemporanément à partir de :

-Benzylpénicilline (1 000 000 U) :	0,6 g
-Eau physiologique:	460 µL
-NaOH 1N stérile :	240 µL
-Rouge de phénol 0,3 % dans l'eau distillée:	300 µL

Le mélange a été incubé à 37°C puis on a observé la réaction toutes les 10 minutes. Le virage du mélange du rouge pourpre au jaune signifie une réaction positive.

3.1.2. Détermination de la longueur d'onde d'absorption optimale pour la mesure de l'activité bêta-lactamase dans le visible

3.1.2.1. Spectre d'absorption du substrat benzylpénicilline

Pour préparer le substrat benzylpénicilline on a dissout 0,6 g de benzylpénicilline (1 000 000 U) dans 760 µL d'eau physiologique. On a ajouté 240 µL d'une solution de NaOH 1N puis homogénéisé. Le milieu réactionnel est composé de :

- 600 µL d'eau physiologique
- 50 µL du substrat benzylpénicilline

Les DO ont été lues à 340, 405, 505, 546, 578 et 630 nm.

3.1.2.2. Spectre d'absorption du produit d'hydrolyse du substrat par la bêta-lactamase (acide pénicilloïque)

On a réalisé un mélange composé de :

- | | |
|--|--------|
| - Eau physiologique : | 500 µL |
| - Substrat benzylpénicilline : | 50 µL |
| - Extrait brut de bêta-lactamase dilué au 1/5 ^e : | 100 µL |

Le mélange a été incubé à 37° C pendant 40 minutes et les DO ont été déterminées à 340, 405, 505, 546, 578, et 630 nm.

3.1.2.3. Spectre d'absorption du rouge de phénol

Le substrat-réactif a été préparé extemporanément (comme indiqué antérieurement) à partir de :

- | | |
|---|--------|
| -Benzylpénicilline (1 000 000 U) : | 0,6 g |
| -Eau physiologique : | 460 µL |
| -NaOH 1N stérile : | 240 µL |
| -Rouge de phénol 0,3 % dans l'eau distillée : | 300 µL |

A 50 μL de substrat- réactif on a ajouté 500 μL d'eau physiologique et 100 μL de tampon de lyse. La densité optique de ce témoin-substrat a été lue à 340, 405, 505, 546, 578, et 630 nm en vue de déterminer son spectre d'absorption.

3.1.2.4. Spectre d'absorption du rouge de phénol après hydrolyse de la benzylpénicilline

A 50 μL du substrat-réactif, on ajoute 500 μL d'eau physiologique et 100 μL d'extrait brut de bêta-lactamase. La réaction d'hydrolyse (diminution progressive de la DO du milieu réactionnel) a été suivie au spectrophotomètre. Elle est complète lorsque la DO ne diminue plus. Les DO ont été ensuite lues à 340, 405, 505, 546, 578 et 630 nm.

La longueur d'onde optimale retenue est celle qui permet d'obtenir la DO la plus élevée pour le rouge de phénol avant hydrolyse (meilleure sensibilité) et la plus faible pour le rouge de phénol après hydrolyse du substrat (meilleure spécificité).

3.1.3. Détermination de l'activité bêta-lactamase

3.1.3.1. Principe

La détermination de l'activité de la bêta-lactamase produite par *Escherichia coli* a été faite en s'inspirant du test acidimétrique en tubes en milieu liquide de Syre [1981] décrite par Courvallin [1985]. La benzylpénicilline est hydrolysée par la bêta-lactamase par clivage du cycle bêta-lactame, avec formation de l'acide pénicilloïque et libération d'un proton.

Le proton H^+ libéré réagit avec le groupe SO_3^- du rouge de phénol. Il en résulte une réduction qui se traduit par le virage du rouge de phénol (phénolsulfonephthaléine = [Alpha-(4-hydroxonio-2,5-cyclohexadiène-1-ylidène)-alpha-(4hydroxyphényl)-2-toluène-sulfonate]) du rouge pourpre au jaune (Figure 10). Le changement de couleur du rouge de phénol se traduit par une variation de DO qui est lue au spectrophotomètre. La disparition

d'une mole de benzylpénicilline entraîne le transfert d'un proton à la molécule de rouge de phénol.

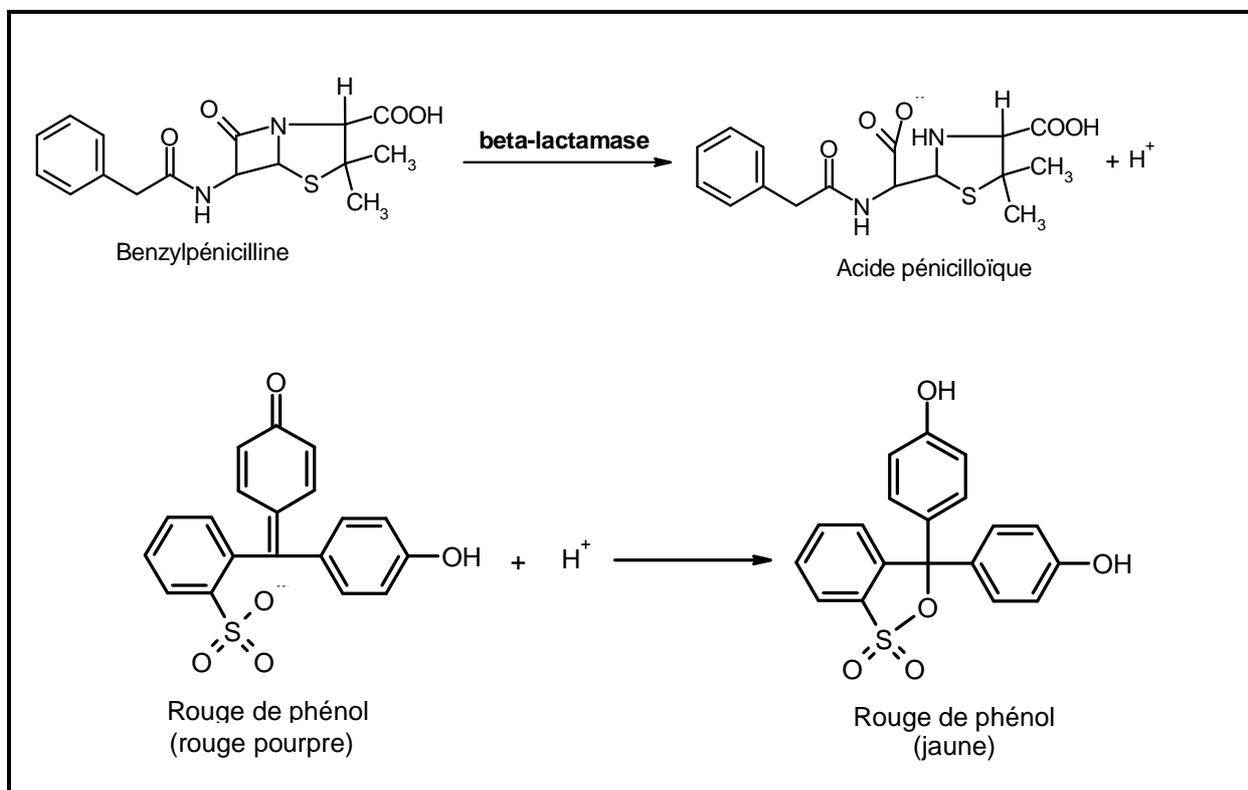


Figure 10 : Hydrolyse de la molécule de benzylpénicilline par la bêta-lactamase et interaction avec le rouge de phénol.

3.1.3.2. Détermination du coefficient d'extinction molaire ϵ

Une droite d'étalonnage du substrat-réactif au rouge de phénol a été réalisée. A partir d'une solution-mère de substrat-réactif à 195,34 μM de rouge de phénol, on a effectué une gamme de dilutions au 2/3, 1/2, 2/5, 1/3, 1/4, 1/5 et au 1/8^e.

Les densités optiques correspondantes ont permis de tracer la droite d'étalonnage du rouge de phénol à partir de laquelle on a déterminé le coefficient d'extinction molaire du substrat-réactif à la longueur d'onde d'absorption maximale.

En appliquant la Loi de Beer-Lambert citée par Williams [1981],

$$\varepsilon l = DO/C$$

ε est le coefficient d'extinction molaire, l est le trajet optique, C est la concentration en substrat de la solution dont la densité optique (DO) est mesurée.

Les droites d'étalonnage obtenues pour 10 séries d'étalonnage successives ont conduit à la détermination d'une valeur moyenne du coefficient d'extinction molaire ε_m .

3.1.3.3. Cinétique enzymatique de la bêta-lactamase

Pour la mise en évidence de l'activité bêta-lactamase on a mélangé :

- Extrait brut de non BLSE dilué au 1/5
- ou extrait brut de BLSE 100 μ l
- Eau physiologique 500 μ l
- Substrat réactif 50 μ l

La densité optique (DO) a été lue toutes les 30 secondes pendant 4 minutes à la longueur d'onde d'absorption maximale. Il s'agit d'une cinétique décroissante dont la vitesse maximale a été déterminée par des concentrations variables du substrat dans le milieu réactionnel. Un témoin a été réalisé avec le tampon de lyse à la place de l'extrait brut de bêta-lactamase.

L'unité enzymatique est la quantité d'enzyme qui catalyse l'hydrolyse d'une micromole (μ mol) de substrat par minute.

3.2. Détermination du pHi des bêta-lactamases par chromatofocalisation

3.2.1. Chromatofocalisation des extraits bruts de bêta-lactamases

En préalable à la chromatofocalisation, les extraits bruts de bêta-lactamase (non BLSE et BLSE) ont été soumis à une dialyse contre du tampon phosphate 10 mM, pH 7,0.

Une colonne (1 cm x 9 cm ; 7,5 mL) de Polybuffer Exchanger PBE 94 a été équilibrée avec du tampon imidazole 25 mM, HCl, pH 7,4, Triton X 100,

0,1 % à une vitesse de 20 mL/h. Après dépôt de 1 mL d'extrait brut de bêta-lactamase (non BLSE ou BLSE) et lavage de la colonne avec le tampon de départ, l'élution a été faite par un gradient de pH réalisé par le Polybuffer PB 74; HCl pH 3,8 ; Triton X 100, 0,1 % à 10 mL/h.

Le profil isoenzymatique des différentes fractions a été effectué dans l'UV à la longueur d'onde optimale de 240 nm et le profil protéique a été réalisé à 280 nm.

3.2.2. Mesure de l'hydrolyse de la benzylpénicilline dans l'UV

La détermination des profils isoenzymatiques des bêta-lactamases (non BLSE et BLSE) par chromatofocalisation, implique l'évaluation de la cinétique enzymatique ($\Delta DO/min$) dans les différents tubes d'élution. Puisque les fractions ont été éluées à des pH différents au cours de la chromatofocalisation, la détermination de la vitesse d'hydrolyse de la benzylpénicilline a été faite dans l'UV.

3.2.1.1. Détermination de la longueur d'onde d'absorption optimale

Le spectre d'absorption de la benzylpénicilline (200 μ g/mL) a été déterminé par balayage spectral entre 180 nm et 340 nm. La longueur d'onde d'absorption optimale est celle qui permet d'avoir dans les limites des lois de la spectrophotométrie d'absorption moléculaire :

- une DO significativement élevée pour la benzylpénicilline (bonne sensibilité)
- une DO relativement faible pour le produit d'hydrolyse de la benzylpénicilline (bonne spécificité).

Par ailleurs, les spectres d'absorption de l'EDTA et de l'azide de sodium ont été réalisés par lecture des DO de solutions de concentrations respectives 5 mg/mL et 1,86 mg/mL. La gamme de détermination des absorbances a couvert les longueurs d'onde de 180 à 340 nm.

3.2.1.2. Cinétique enzymatique dans l'UV

La cinétique enzymatique en UV a été faite suivant le protocole de Samuni [1975] :

Fraction éluée après chromatofocalisation	100 µl
Benzylpénicilline (200 µg/ml)	2 mL

La densité optique (DO) a été lue toutes les 2 minutes pendant 10 minutes à la longueur d'onde d'absorption maximale de la benzylpénicilline.

3.3. Inhibition des extraits bruts de bêta-lactamase par des extraits d'organes de plantes de la pharmacopée africaine

Une solution aqueuse à 200 mg/mL de chaque extrait total éthanolique d'organe de plante a été préalablement stérilisée par passage sur membrane de stérilisation (diamètre 0,2 µm). La stérilité de l'extrait a été confirmée par ensemencement et culture sur gélose et bouillon trypticase soja et coloration de Gram.

Le test d'inhibition de la bêta-lactamase a été réalisé par mélange de :

Eau physiologique :	480 µL
Extrait brut de bêta-lactamase :	100 µL
Extrait total de plante :	20 µL

On a incubé à 37° C pendant 1 heure (temps d'inhibition) puis on a ajouté au mélange, 50 µL de substrat-réactif. L'extrait total éthanolique d'organe de plante est alors à une concentration de 2 mg/mL dans le milieu réactionnel.

La DO a été lue à 578 nm à 37° C toutes les 30 secondes pendant 4 minutes afin de déterminer l'activité résiduelle.

Un témoin sans extrait de plante a permis la détermination de l'activité initiale de l'extrait brut de bêta-lactamase.

Le pourcentage d'inhibition (*PI*) de la bêta-lactamase par les extraits totaux d'organes a été obtenu par la formule :

$$PI = \frac{AE. \text{ bêta-lactamase initiale} - AE. \text{ bêta-lactamase résiduelle}}{AE \text{ bêta-lactamase initiale}} \times 100\%$$

AE : activité Enzymatique

La figure 11 résume le protocole d'étude de l'inhibition des bêta-lactamases extraites de *E. coli* par les extraits de plantes.

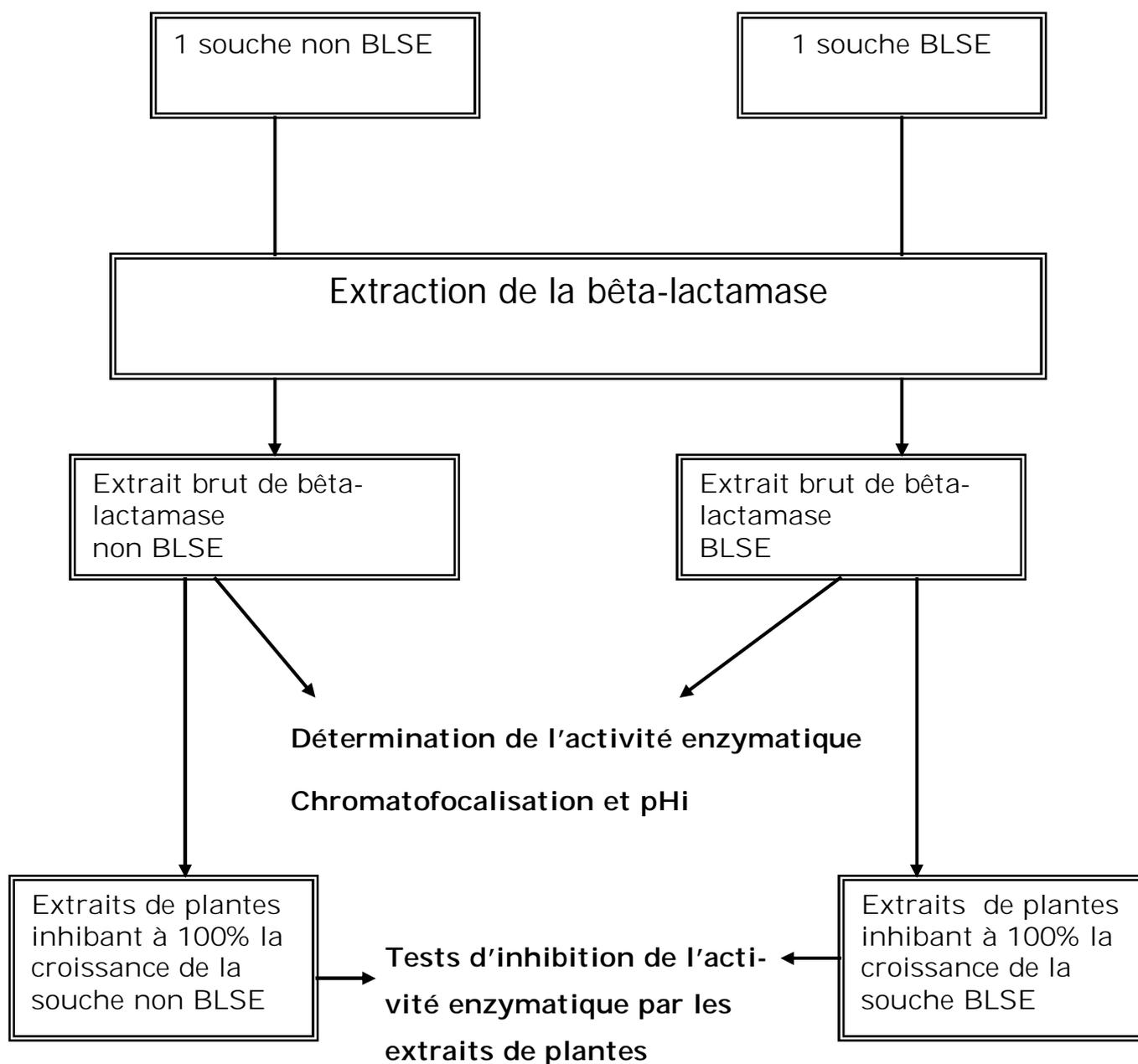


Figure 11 : Protocole d'étude biochimique des bêta-lactamases extraites de *E. coli* ; inhibition par les extraits de plante

CHAPITRE 2 :

RÉSULTATS

1. MISE AU POINT DE LA DÉTERMINATION L'ACTIVITÉ BÊTA LACTAMASE DANS LE VISIBLE

1.1. Extraction de la bêta-lactamase de *E . coli*

Les contrôles de stérilité des extraits bruts de bêta-lactamases (BLSE et non BLSE) avant et après concentration sur cellule Amicon® ont été satisfaisants. Par ailleurs, l'addition de l'azide de sodium pour la conservation de l'extrait n'a eu aucun effet inhibiteur ou activateur sur l'enzyme, de même que l'éthanol qui a servi de solvant pour le rouge de phénol. Le passage sur cellule Amicon® a permis de concentrer 10 fois l'activité BLSE.

La détermination qualitative de l'activité bêta-lactamase a révélé que le virage du rouge de phénol intervient dans l'intervalle de 10 à 30 minutes pour l'extrait non concentré tandis qu'il a lieu instantanément dans le cas de l'extrait concentré.

1.2. Longueur d'onde d'absorption optimale

1.2.1. Spectres d'absorption du substrat et de son produit d'hydrolyse par la bêta lactamase

Tableau X: Spectres d'absorption du substrat (benzylpénicilline) et de son produit d'hydrolyse (acide pénicilloïque) par la bêta lactamase

λ (nm)	340	405	505	546	578	630
DO benzylpénicilline	0,135	0,649	1,592	1,441	0,050	1,259
DO acide pénicilloïque	0,283	0,597	1,547	1,395	0	1,207

Les DO du substrat benzylpénicilline et celles de son produit d'hydrolyse ont été déterminées à différentes longueurs d'onde dans le visible (Tableau X). Ce balayage spectral révèle que les DO les plus faibles sont enregistrées à 578 nm (0,050 pour le substrat et 0 pour le produit).

1.2.2. Spectres d'absorption du rouge de phénol avant et après hydrolyse de la benzylpénicilline

Les DO du substrat-réactif ont été déterminées à différentes longueurs d'onde. Après hydrolyse complète du substrat par la bêta lactamase, on effectue le balayage spectral du mélange. A 578 nm le substrat-réactif présente une absorbance relativement élevée alors que son produit d'hydrolyse a une absorbance pratiquement nulle. (Tableau XI, Figure 12).

Tableau XI : Spectres d'absorption du rouge de phénol avant et après l'hydrolyse de la benzylpénicilline

λ (nm)	340	405	505	546	578	630
DO avant Hydrolyse	1,011	0,776	2,395	4,932	1,116	1,154
DO après hydrolyse	1,265	0,667	1,958	1,472	0,006	1,180

Ces séries de balayages spectraux du substrat, de son produit d'hydrolyse, du rouge de phénol avant et après hydrolyse du substrat montrent une meilleure sensibilité de la méthode à 546 nm (DO la plus élevée à pH = 8,0) et une meilleure spécificité à 578 nm (DO la plus faible après hydrolyse du substrat). La longueur d'onde de 578 nm a été donc retenue pour la détermination de l'activité bêta-lactamase en cinétique décroissante.

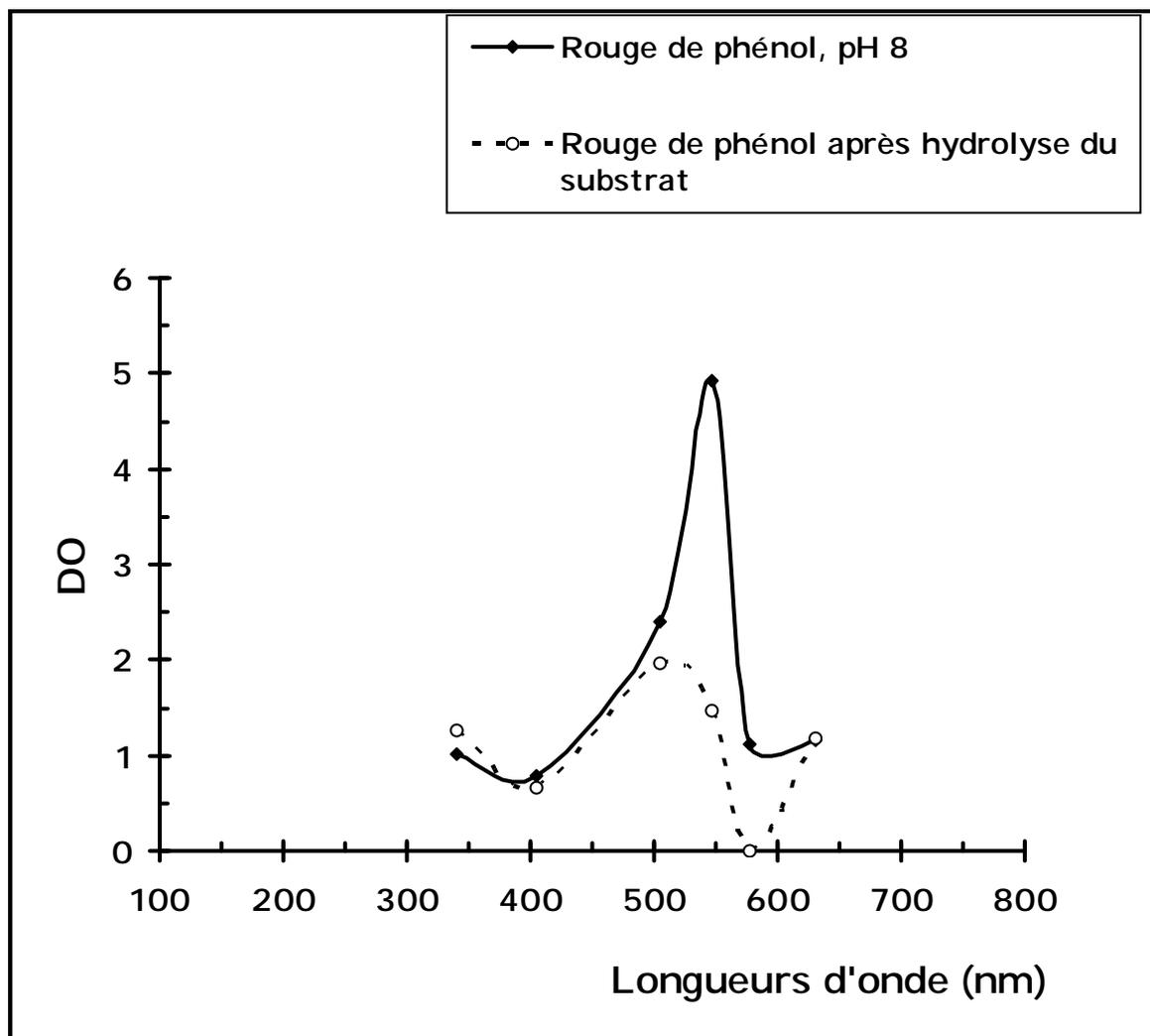


Figure 12 : Spectres d'absorption du rouge de phénol avant et après hydrolyse de la benzylpénicilline.

1.3. Détermination de l'activité enzymatique

1.3.1. Détermination du coefficient d'extinction molaire ϵ du rouge de phénol

La lecture spectrophotométrique à 578 nm de la gamme de dilutions de la solution-mère du substrat réactif a permis d'obtenir une courbe linéaire pour des concentrations en rouge de phénol compris entre 24,42 et 195,34 μM .

En appliquant la loi de Beer-Lambert citée par Williams [1981],

$$\epsilon = \text{DO}/C.l$$

C étant la concentration du substrat et l le trajet optique.

Le rapport de la moyenne des DO sur la moyenne des concentrations, donne la valeur du coefficient d'extinction qui, rapporté à une mole correspond au coefficient d'extinction molaire.

On obtient donc $\varepsilon = 6,34 \cdot 10^{-3} \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, soit $6,34 \cdot 10^3 \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Les droites d'étalonnage obtenues avec dix séries successives (Tableau XII) conduisent à la détermination d'une valeur moyenne du coefficient d'extinction molaire.

Tableau XII : Valeurs du coefficient d'extinction molaire

Séries	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
$\varepsilon_x (10^3 \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$	6,34	5,45	6,17	5,80	5,74	5,23	6,15	5,25	5,08	5,95

$$\varepsilon_m = 5.71 \cdot 10^3 \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

L'écart type σ est égal à 0,44.

Le coefficient de variation (CV) est de 7,7%.

1.3.2. Cinétique des activités des extraits bruts de bêta-lactamases dans le visible

L'hydrolyse du substrat-réactif au rouge de phénol par les extraits bruts de bêta-lactamase (non BLSE et BLSE) est une cinétique décroissante. Les $\Delta\text{DO}/\text{min}$ sont de $-0,032/\text{min}$ et $-0,0267/\text{min}$ respectivement pour l'extrait brut de non BLSE (dilué à 1/5) et pour l'extrait brut de BLSE. L'unité enzymatique est la quantité d'enzyme qui hydrolyse $1 \mu\text{mole}$ de substrat par minute.

Les vitesses respectives d'hydrolyse de la benzylpénicilline sont de **43 $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}$** pour la non BLSE et **4,55 $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}$** pour la BLSE, soit des activités respectives de **43 U et de 4,55 U** d'extrait brut concentré de bêta-lactamase (Tableau XIII).

Par ailleurs, la cinétique de l'hydrolyse du substrat benzylpénicilline à 578 nm donne une moyenne des $\Delta\text{DO}/\text{min}$ égale à 0,00025. Elle est donc négligeable dans la détermination de l'activité bêta-lactamase. L'hydrolyse spontanée de la benzylpénicilline est en effet beaucoup plus lente que la cinétique enzymatique de son hydrolyse par la bêta-lactamase.

Tableau XIII : Activité enzymatique des extraits bruts de bêta-lactamase

Bêta-lactamases	$\Delta\text{DO}/\text{min}$	Activité enzymatique (U)
BLSE	-0,0267	4,55
Non BLSE (diluée au 1/5)	-0,032	43

2. CHROMATOFOCALISATION DES EXTRAITS BRUTS DE BÊTA-LACTAMASES

2.1. Spectre d'absorption du substrat benzylpénicilline dans l'UV

Le spectre d'absorption dans l'UV de la benzylpénicilline à la concentration de 200 $\mu\text{g/mL}$ présente une absorption maximale entre 210 et 220 nm. On note une absorption non négligeable à 240 nm correspondant à une densité optique de 0,52 (Figure13). Par ailleurs, on note une importante absorption aussi bien de l'EDTA que de l'azide de sodium à 240 nm ce qui justifie la dialyse effectuée avant l'étape de chromatofocalisation (Figure 14).

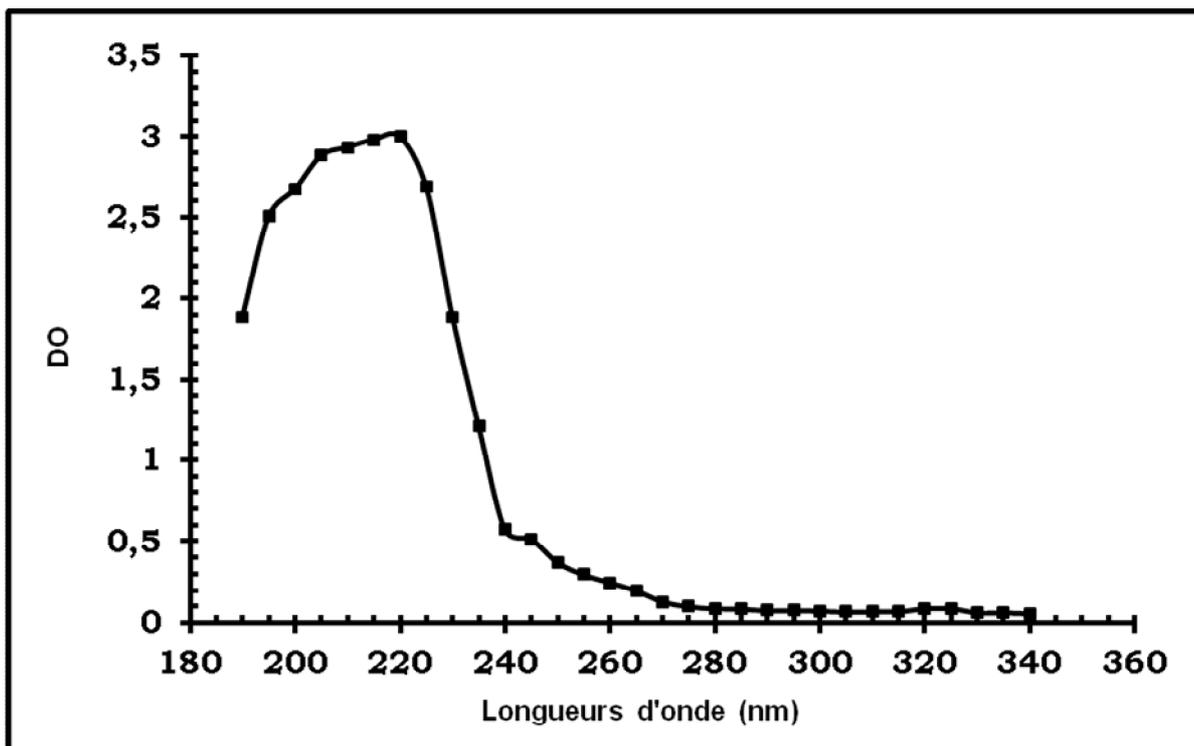


Figure 13 : Spectre d'absorption dans l'UV de la benzylpénicilline

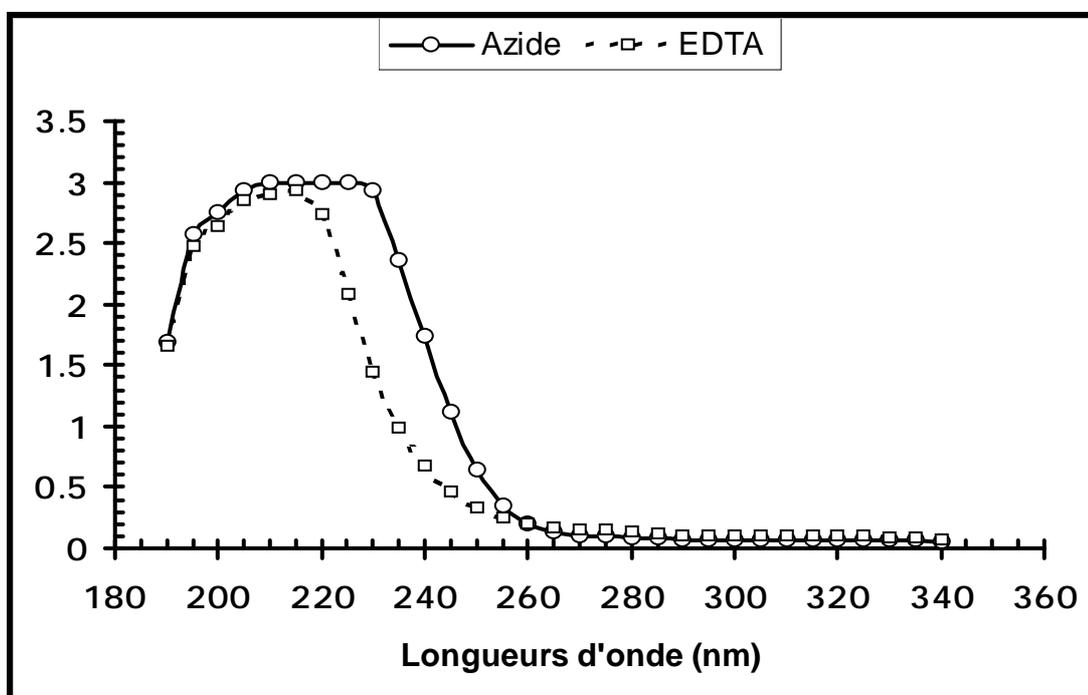
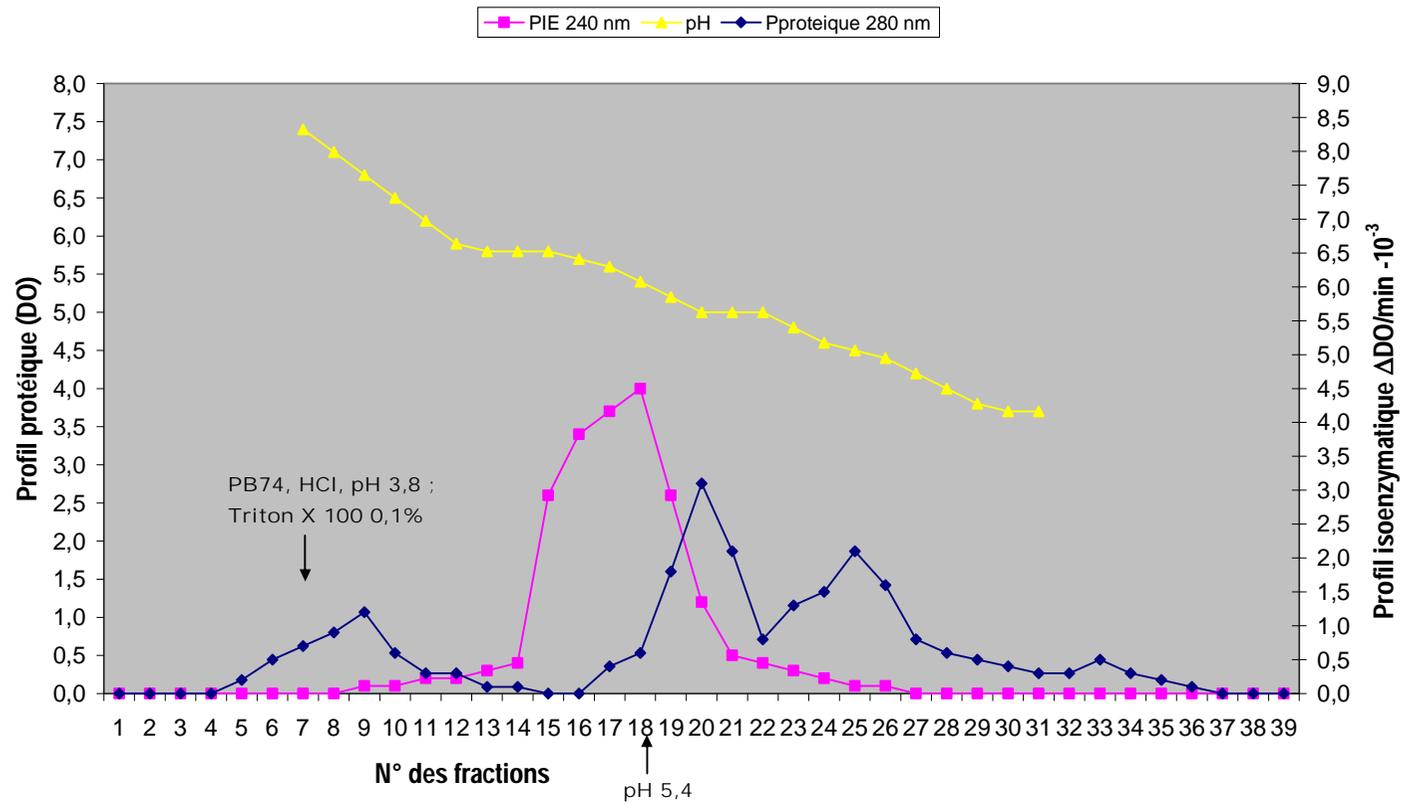


Figure 14 : Spectres d'absorption dans l'UV de l'azide de sodium et de l'EDTA

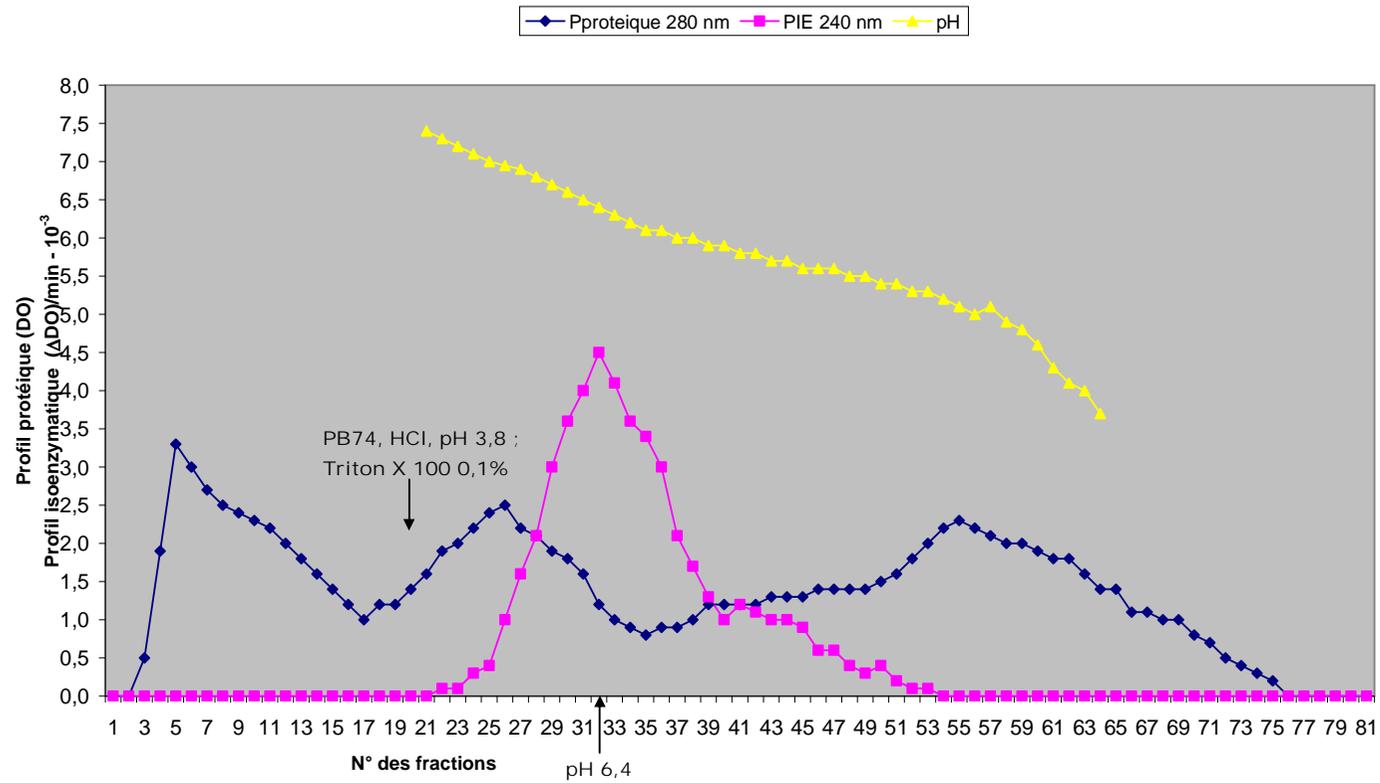
2.2. Profil d'éluion des bêta-lactamases par chromatofocalisation

Par chromatofocalisation, les activités BLSE et non BLSE sont éluées dans le gradient de pH en un seul pic, respectivement à pH 6,4 et 5,4 (Figures 15, 16). Ces pics d'activité BLSE et non BLSE sont bien isolés des pics d'éluion des autres protéines constituant le profil protéique.



PIE = Profil isoenzymatique

Figure 15: Profil d'éluion de l'activité non BLSE par chromatofocalisation



PIE = Profil isoenzymatique

Figure 16 : Profil d'élution de l'activité BLSE par chromatofocalisation

3. INHIBITION DES BÊTA-LACTAMASES PAR LES EXTRAITS D'ORGANES DE PLANTES

3.1. Inhibition de l'extrait brut de non BLSE par les extraits totaux éthanoliques de plantes

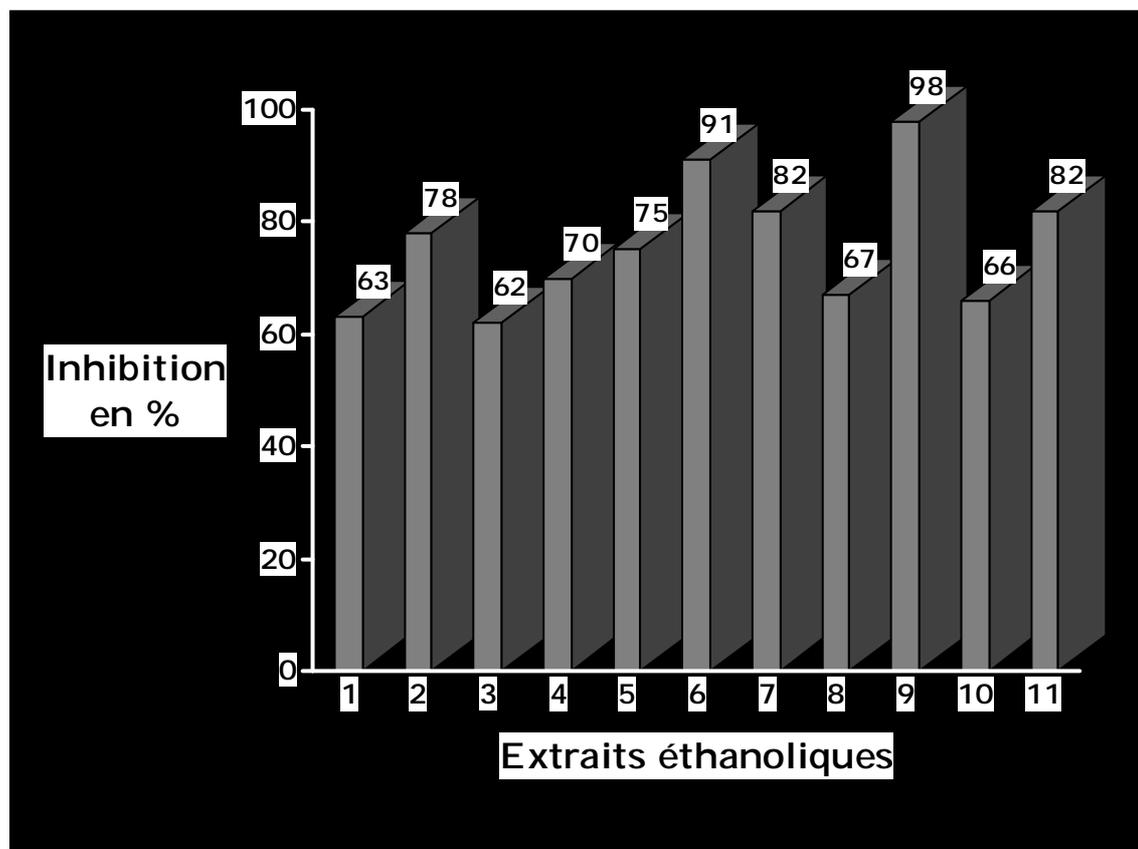


Figure 17: Inhibition de l'extrait brut de bêta-lactamase non BLSE

1- *Baillonella toxisperma*

2- *Boswellia dalzielii*

3- *Carapa procera*

4- *Ceiba pentandra*

5- *Enantia chloranta*

6- *Ficus exasperata*

7- *Flacourtia flavescens*

8- *Piptadeniastrum africanum*

9- *Terminalia superba*

10- écorces de *Voacanga qfricana*

11- graines de *Voacanga africana*

Les onze extraits totaux d'organes d'espèces végétales qui inhibent à 100 % la croissance de la souche de *E. coli* productrice de non BLSE

exercent également une action inhibitrice supérieure à 50% sur la bêta-lactamase extraite de cette souche. Cette action correspond à des pourcentages d'inhibition allant de 62% à 98% (Figure 17).

3.2. Inhibition de l'extrait brut de BLSE par les extraits totaux éthanoliques de plantes

Le test d'inhibition de l'extrait brut de BLSE est réalisée avec les huit extraits totaux éthanoliques de plantes qui ont inhibé à 100% la croissance de la souche de *E. coli* productrice de BLSE (Figure 18).

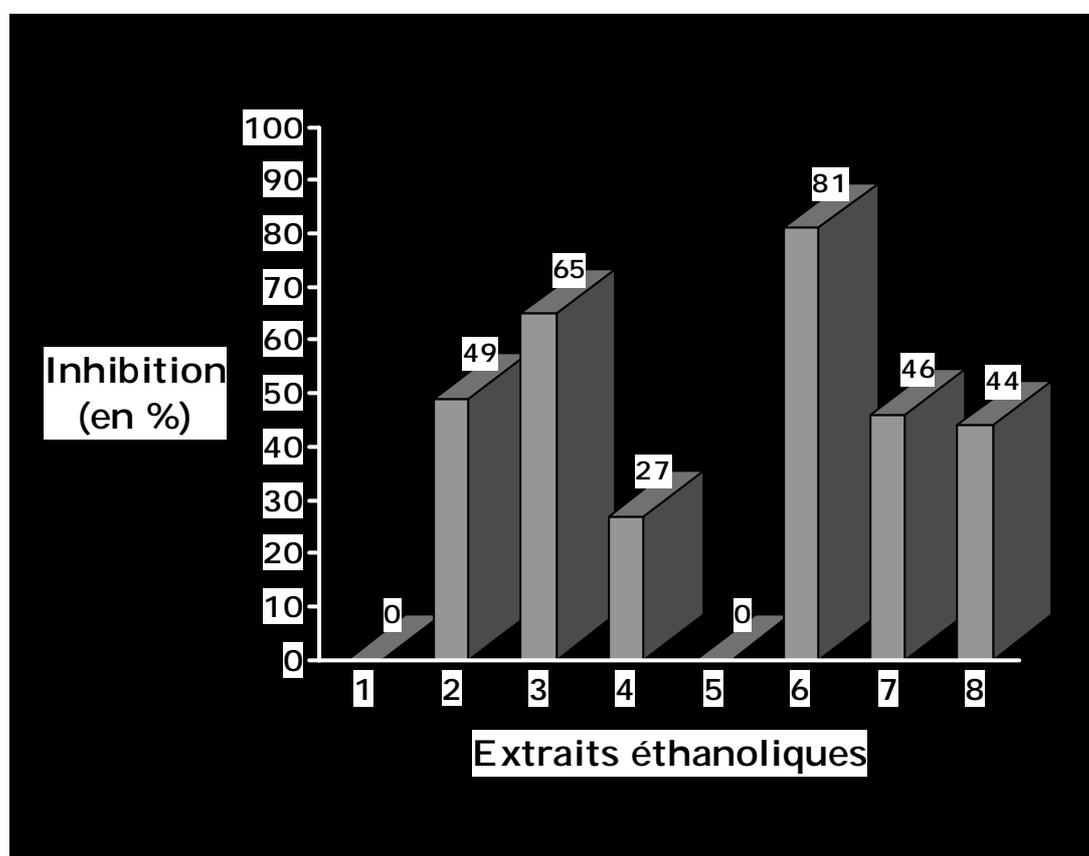


Figure 18 : Inhibition de l'extrait brut de BLSE

- | | |
|-----------------------------------|--|
| 1- <i>Baillonella toxisperma</i> | 5- <i>Psidium guajava</i> |
| 2- <i>Boswellia dalzielii</i> | 6- <i>Terminalia superba</i> |
| 3- <i>Canarium schweinfurthii</i> | 7- écorces de <i>Voacanga qfricana</i> |
| 4- <i>Flacourtia flavescens</i> | 8- graines de <i>Voacanga africana</i> |

L'extrait éthanolique de *Terminalia superba* a montré le taux d'inhibition le plus élevé de 81 % sur l'extrait brut de BLSE de type TEM (Figure 18). L'extrait total éthanolique de *Canarium schweinfurthii* a inhibé à 65% l'extrait brut de BLSE. On note que deux extraits de plantes, *Baillonella toxisperma* et *Psidium guajava* n'inhibent pas l'activité enzymatique de la BLSE.

L'espèce végétale *Terminalia superba* a été retenue pour une étude phytochimique approfondie, compte tenu de son action inhibitrice relativement élevée sur les extraits bruts de bêta-lactamases.

3.3. Tests d'inhibition de la bêta-lactamase par 4 extraits de plantes sans action inhibitrice sur la croissance de la souche de *E. coli* non BLSE

Les extraits de plante sans activité antimicrobienne ne sont pas totalement dénués d'intérêt dans la recherche d'inhibiteurs de bêta-lactamases. En effet, quatre de ces extraits ont exercé une inhibition atténuée (environ 60%) sur l'extrait d'enzyme non BLSE de type TEM (Tableau XIV).

Tableau XIV: Inhibition de la bêta-lactamase non BLSE par 4 extraits de plantes qui n'inhibent pas la croissance de la souche de *E. coli*

Espèces végétales	Famille	Organe utilisé	Pourcentage d'inhibition
<i>Trema orientalis</i>	Ulmaceae	Feuille	64
<i>Aloe barteri</i>	Aloeaceae	Feuille	66
<i>Caloncoba welwitschii</i>	Flacourtiaceae	Ecorce	67
<i>Annona senegalensis</i>	Annonaceae	Feuille	61

CHAPITRE 3 :

DISCUSSION

La complexité du milieu réactionnel justifie l'évaluation des molécules interférentes lors de la mise au point de la méthode de détermination de l'activité bêta-lactamase.

La longueur d'onde de 578 nm retenue pour la mesure de l'activité bêta-lactamase correspond dans notre étude à la longueur d'onde d'absorption optimale du rouge de phénol (phénolsulfonephtaléine). A cette longueur d'onde, les absorbances imputables aux autres molécules du milieu réactionnel sont négligeables. Il s'agit de la benzylpénicilline, de l'acide pénicilloïque et du complexe coloré jaune du rouge de phénol après hydrolyse de la benzylpénicilline. Seul le complexe coloré rouge a une absorbance significative à 578 nm. Ceci traduit une bonne spécificité de la mesure de l'activité bêta-lactamase à 578 nm.

Nos résultats sont confortés par certaines données de la littérature. Moris-Varas *et al* [1999] ont insisté sur l'intérêt de l'utilisation des indicateurs de pH pour évaluer l'activité enzymatique des hydrolases. Ces auteurs, à l'issue d'une étude sur les estérases ont précisé que l'hydrolyse de plusieurs substrats entraînerait la formation d'un composé acide susceptible de faire varier le pH. Les meilleurs indicateurs de pH seraient le bleu de bromothymol et le rouge de phénol. La diminution de l'absorbance à 558 nm du rouge de phénol, suite à l'acidification du milieu réactionnel a été également mise à profil dans la détermination de l'activité de la phospholipase A [Lobo de Araujo *et al*, 1987].

Un élément important dans notre étude est la définition de l'unité enzymatique. Yu *et al* [2002] ont évalué la vitesse de synthèse de la phosphoarginine sous l'action de l'arginine kinase en déterminant la vitesse de diminution de la DO d'un indicateur coloré (la phénolsulfonephtaléine). L'unité enzymatique a été définie comme la quantité d'enzyme qui catalyse la production d'une micromole de proton H⁺/min. Ces considérations viennent renforcer la définition que nous avons donnée de l'unité enzymatique de la bêta-lactamase.

Samuni [1975] a montré qu'en UV, la benzylpénicilline et son produit d'hydrolyse, l'acide pénicilloïque présentent un maximum d'absorption à 210 nm, mais qu'ils ont une différence d'absorbance à 240 nm suffisamment importante pour que cette longueur d'onde soit considérée comme optimale et retenue pour l'évaluation de l'activité bêta-lactamase. Chang [2001] et Ma [2005] ont utilisé respectivement les longueurs d'onde de 240 nm et 233 nm pour suivre l'hydrolyse de la benzylpénicilline par la bêta-lactamase. Ceci justifie le choix de la longueur d'onde de 240 nm pour la réalisation du profil isoenzymatique à l'issue de la chromatofocalisation.

Les résultats de la détection microbiologique, du génotypage et le pHi 5,4 permettent de déduire que la bêta-lactamase extraite de la souche non BLSE est l'enzyme TEM1. Les non BLSE de type TEM présentes chez *E. coli* ont des pHi de 5,4 (TEM-1) et 5,6 (TEM 2) [Bradford, 2001]. Le même auteur précise que les BLSE de type TEM dont les pHi ont été déterminés ont des valeurs comprises entre 5,2 et 6,5. Il faut souligner qu'avec le nombre croissant de BLSE de type TEM chez les entérobactéries en général et chez *E. coli* en particulier, plusieurs bêta-lactamases pourraient avoir le même pHi. Ceci justifie le recours à trois méthodes différentes (méthodes microbiologique, biochimique et de biologie moléculaire) pour l'identification des bêta-lactamases.

La chromatofocalisation a permis d'éluer les deux bêta-lactamases en un seul pic bien individualisé ; ceci suggère que les deux souches de *E.coli* étudiées ne renferment respectivement qu'un seul type de non BLSE et un seul type de BLSE.

La détermination des profils isoenzymatiques des bêta-lactamases (non BLSE et BLSE) après la chromatofocalisation a été réalisée dans l'UV car les fractions éluées sont susceptibles d'avoir des pH différents au cours de l'élution chromatographique. La détermination de l'activité enzymatique avec le substrat -réactif au rouge de phénol n'est donc pas indiquée dans ce cas à cause de sa sensibilité au pH du milieu.

Dans le but de mettre en évidence la présence d'inhibiteurs de bêta-lactamase (non BLSE ou BLSE) dans les extraits totaux d'organes de plantes, les activités enzymatiques de ces deux bêta-lactamases ont été déterminées en présence de ces extraits totaux à la concentration de 6,15 mg/mL dans le milieu réactionnel.

Les onze extraits totaux d'organes d'espèces végétales qui inhibent à 100 % la croissance de la souche de *E. coli* productrice de bêta-lactamase non BLSE exercent également une action inhibitrice sur la bêta-lactamase extraite de cette souche. Cette action correspond à des pourcentages d'inhibition allant de 62% (*Carapa procera*) à 98% (*Terminalia superba*).

A la concentration de 6,15 mg/mL dans le milieu réactionnel, cinq plantes (*Boswellia dalzielii*, *Canarium schweinfurthii*, *Flacourtia flavescens*, *Voacanga africana* et surtout *Terminalia superba*) expriment la présence d'inhibiteurs de BLSE. Les extraits totaux éthanoliques de *Terminalia superba* et de *Canarium schweinfurthii* ont inhibé respectivement à 81 % et à 65% l'extrait brut de BLSE de type TEM.

En somme, ces plantes semblent receler d'une part un principe actif qui inhibe un processus métabolique impliqué dans la croissance de la bactérie et d'autre part un principe actif inhibiteur de la bêta-lactamase sécrétée par *E. coli*.

Le mécanisme d'action antibactérienne de ces extraits de plantes pourrait de ce fait être rapproché de celui des bêta-lactamines en association avec un inhibiteur de bêta-lactamase [Courvallin *et al*, 1985; Berche *et al*, 1989]. Cette action qui se déroule en deux étapes successives implique :

- un inhibiteur de bêta-lactamase.
- l'action des bêta-lactamines, susceptibles d'inhiber la synthèse de la paroi des BGN.

Par ailleurs, on note que *Baillonella toxisperma* et *Psidium guajava* n'inhibent pas l'activité enzymatique de la BLSE. Concernant ces deux extraits de plantes, l'absence d'inhibiteurs de BLSE ne saurait être affirmée de façon absolue. On pourrait émettre deux hypothèses :

- la présence d'un inhibiteur de faible affinité pour la BLSE (inhibiteur dont l'activité n'est pas détectable à la concentration utilisée)
- l'existence d'un mécanisme d'action antibactérienne autre que l'inhibition de la BLSE.

De toutes ces espèces végétales, *Terminalia superba* se distingue par les taux d'inhibition les plus élevés sur la BLSE et la non BLSE. L'espèce végétale *Terminalia superba* a été retenue pour une étude phytochimique approfondie, compte tenu de son action inhibitrice relativement élevée sur les extraits bruts de bêta-lactamases.

Enfin Coates *et al* [1994] ont isolé un dérivé de l'acide anarcadique extrait de *Spondia monbin* (Anarcadiaceae) ayant une activité inhibitrice sur la bêta-lactamase. Liang *et al* [2003] ont mis en évidence des activités inhibitrices de dérivés anthracéniques (aloe-émodyne, émodyne et rhéine) extraits de la rhubarbe (Polygonaceae) sur la bêta-lactamase extraite de *Staphylococcus aureus*. Les extraits de *Mammea africana* (Clusiaceae) et de *Adenia lobata* (Passifloraceae) ont exercé une inhibition de plus de 90% sur des extraits de bêta-lactamase de type TEM1 dans une étude réalisée sur des extraits de plantes médicinales camerounaises [Gangoué-Piéboji *et al*, 2007]. Ces données viennent conforter nos résultats en confirmant la présence d'inhibiteurs de bêta-lactamases au sein des plantes médicinales à activité antibactérienne.

Les travaux de Jimenez-Valera *et al* [1987] ont montré l'existence de ces deux types de plantes médicinales : les unes sans activité antibiotique au sens strict, mais inhibiteurs de bêta-lactamases et le second groupe associant les deux propriétés. Dans ce contexte, la nécessité d'un test de détermination de l'activité hydrolysante de la bêta-lactamase vis-à-vis d'une bêta-lactamine en vue de la mise en évidence de l'inhibition par l'extrait de plante s'impose. En effet, l'action inhibitrice de la bêta-lactamase est masquée par l'action antibiotique lors des tests antibactériens. Il est probable que certaines plantes sans activité antibactérienne (essentiellement celles qui sont utilisées en association dans le traitement de

maladies infectieuses) recèlent des inhibiteurs de bêta-lactamases. Au cours de nos travaux nous nous sommes orientés vers les extraits de plantes qui combinent les deux propriétés (action antibiotique et inhibition de l'activité bêta-lactamase).

QUATRIÈME PARTIE :

ÉTUDE PHYTOCHIMIQUE ET PROPRIÉTÉS ANTIBACTÉRIENNES DE *TERMINALIA SUPERBA* (COMBRETACEAE)

CHAPITRE 1 :

CADRE, MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. CADRE

L'étude des propriétés antibactériennes a été réalisée au Laboratoire d'Analyses Biomédicales du Centre d'Information et de Recherche en Santé de la Reproduction (CIRSAR) sis à Cadjehoun, Cotonou. La partie phytochimique de ce travail a été effectuée au Laboratoire de Pharmacognosie et des Huiles Essentielles (LAPHE) affilié à la Faculté des Sciences et Techniques et à la Faculté des Sciences de la Santé de l'Université d'Abomey-Calavi.

2. MATÉRIEL BIOLOGIQUE

Deux souches de *E. coli* isolées d'infections urinaires (une souche productrice de BLSE et une souche non BLSE) et la souche de référence de *E. coli* ATCC 25 922 ont été utilisées.

Les extraits végétaux sont réalisés à partir des écorces, feuilles et racines de *Terminalia superba*.

3. MÉTHODES

3.1. Techniques utilisées

3.1.1. Réalisation des extraits de *Terminalia superba*

La méthode d'extraction utilisée a été la macération : la poudre du matériel végétal a été laissée en contact prolongé avec le solvant afin d'en extraire les principes actifs. La macération a été réalisée à la température ambiante. Pour 10 g de poudre de drogue on a utilisé 50 ml de solvant. Après la macération, le solvant a été évaporé au Rotavapor et le résidu a été séché à l'étuve. Pour les extraits au dichlorométhanol et à l'acétate d'éthyle, le séchage après le passage au Rotavapor n'a pas été nécessaire.

3.1.2. Analyse par CCM

Dans le but de confirmer les résultats du criblage phytochimique des extraits de *Terminalia superba*, la chromatographie sur couche mince (CCM) constitue une étape importante. Cette méthode simple, rapide et peu coûteuse est fréquemment utilisée pour l'analyse des métabolites secondaires contenus dans les extraits de plante.

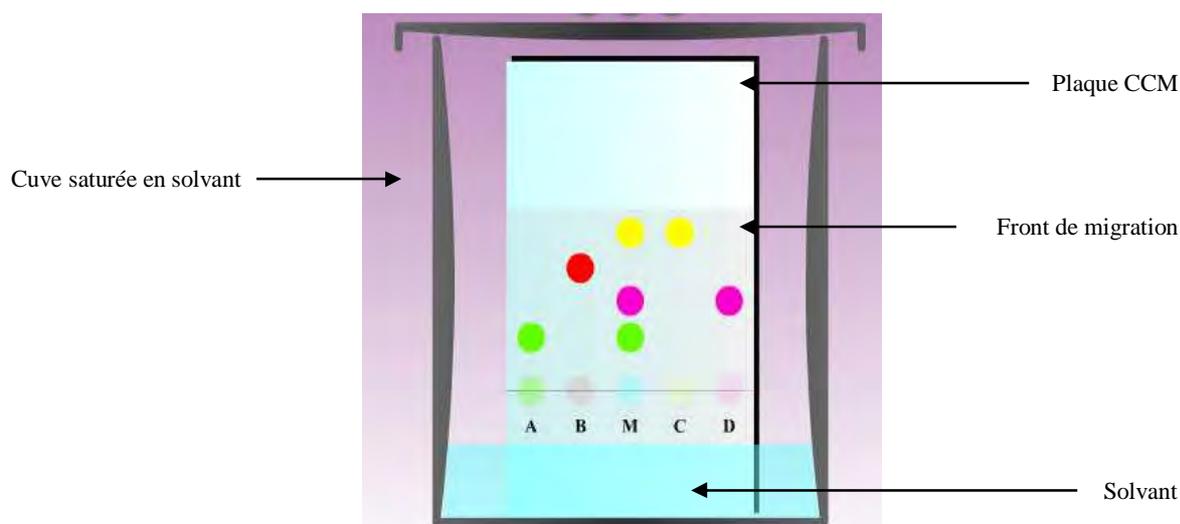


Figure 19 : Schéma d'une cuve de CCM avec un chromatogramme.

A, B, C, et D sont les témoins ; M est l'échantillon dont la composition est déterminée.

La chromatographie sur couche mince est basée sur le système d'adsorption utilisant une phase stationnaire qui est le gel de silice et une phase mobile. La phase mobile est l'éluant composé d'un ou de plusieurs solvants selon les composés qui sont soumis à la séparation.

La migration a lieu dans une cuve étanche (Figure 19) et le chromatogramme est observé à l'UV aux longueurs d'ondes de 254 nm et 365 nm. Cette observation est suivie si nécessaire de la pulvérisation de réactifs spécifiques pour la détection des composés. On détermine alors pour chaque composé le rapport frontal R_f .

$$R_f = \frac{\text{Distance parcourue par le constituant}}{\text{Distance parcourue par le front de migration}}$$

Les plaques TLC Silica gel 60 F₂₅₄ ont été utilisées.

3.2. Analyse phytochimique des organes de *Terminalia superba*

3.2.1. Analyse par CCM des composés mis en évidence par le criblage phytochimique

3.2.1.1. Détection des composés anthracéniques

Préparation des échantillons

L'extraction enrichie en composés anthracéniques a été effectuée à partir de 0,5 g de la poudre de drogue dans 5 mL de méthanol à 50% dans de l'eau distillée. Le mélange a été chauffé au bain-marie pendant 5 minutes puis filtré ; on a déposé 5 et 10 µL du filtrat sur la plaque de CCM.

L'extrait enrichi en composés anthracéniques a été également préparé à partir de l'extrait éthanolique. L'extrait éthanolique a été repris dans du méthanol à 50% dans de l'eau distillée pour obtenir des concentrations de 10 mg/mL et 100 mg/mL. On a déposé 20 µL d'extrait. Une solution d'extrait de séné *Angustifolia folium* a servi de témoin.

Migration et Révélation

La phase mobile utilisée a été un mélange :
acétate d'éthyle – méthanol – eau (100 – 17 – 13)

Après migration puis observation à l'UV à 254 nm et 365 nm, on a pulvérisé une solution de KOH à 7,5 % sur la plaque de CCM.

3.2.1.2. Détection des coumarines

Préparation des échantillons

Pour les extraits enrichis, on a réalisé à partir de la poudre de drogue une suspension à 10% dans du méthanol. Après chauffage au bain-marie pendant 30 minutes, on a effectué une filtration ; le filtrat a été évaporé jusqu'à un volume d'un mL.

Pour obtenir les extraits enrichis en coumarines à partir des extraits éthanoliques, ces derniers ont été repris dans du méthanol à la concentration de 10 mg/mL. On dépose 20 µL d'échantillon et 20 µL du

témoin (composé coumarinique 2 H – chromen -2 – one) à 0,5 mg/mL dans du méthanol.

Migration

Le système de solvant utilisé pour la migration a été le suivant :
Toluène – éther (1 :1) saturé avec 10% d'acide acétique.

3.2.2. Réalisation des extraits totaux

3.2.2.1. Extraits totaux aqueux

Les extraits aqueux ont été réalisés selon le schéma de la Figure 20.

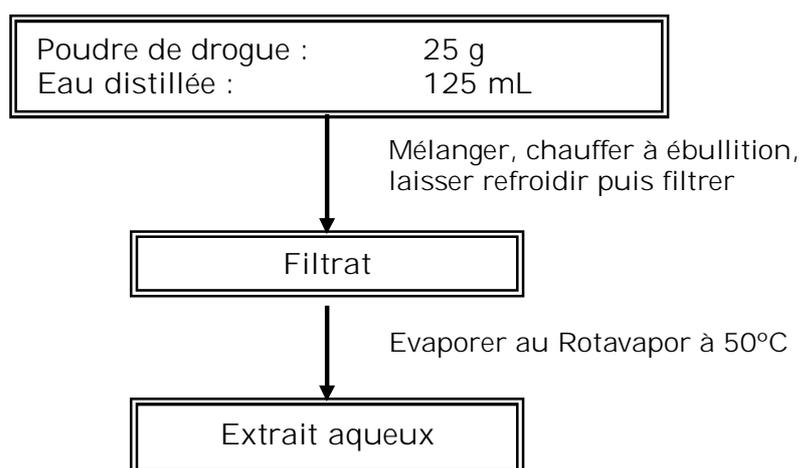


Figure 20 : Réalisation des extraits aqueux

3.2.2.2. Extraits totaux éthanoliques

Les organes séchés sont réduits en poudre. A 100 g de poudre on a ajouté 500ml d'éthanol à 96%. Le mélange a été soumis à une agitation continue pendant 72h puis filtré. Le filtrat a été évaporé dans un évaporateur rotatif de type BÜCHI ROTAVAPOR R200. Le concentré a été séché à l'étuve à 50°C pendant 72 heures.

3.2.2.3. Extraits totaux méthanoliques

Le protocole a été le même que celui utilisé pour les extraits éthanoliques avec 25 g de poudre de drogue pour 250 ml de méthanol.

3.2.3. Extraction par polarités croissantes de solvants

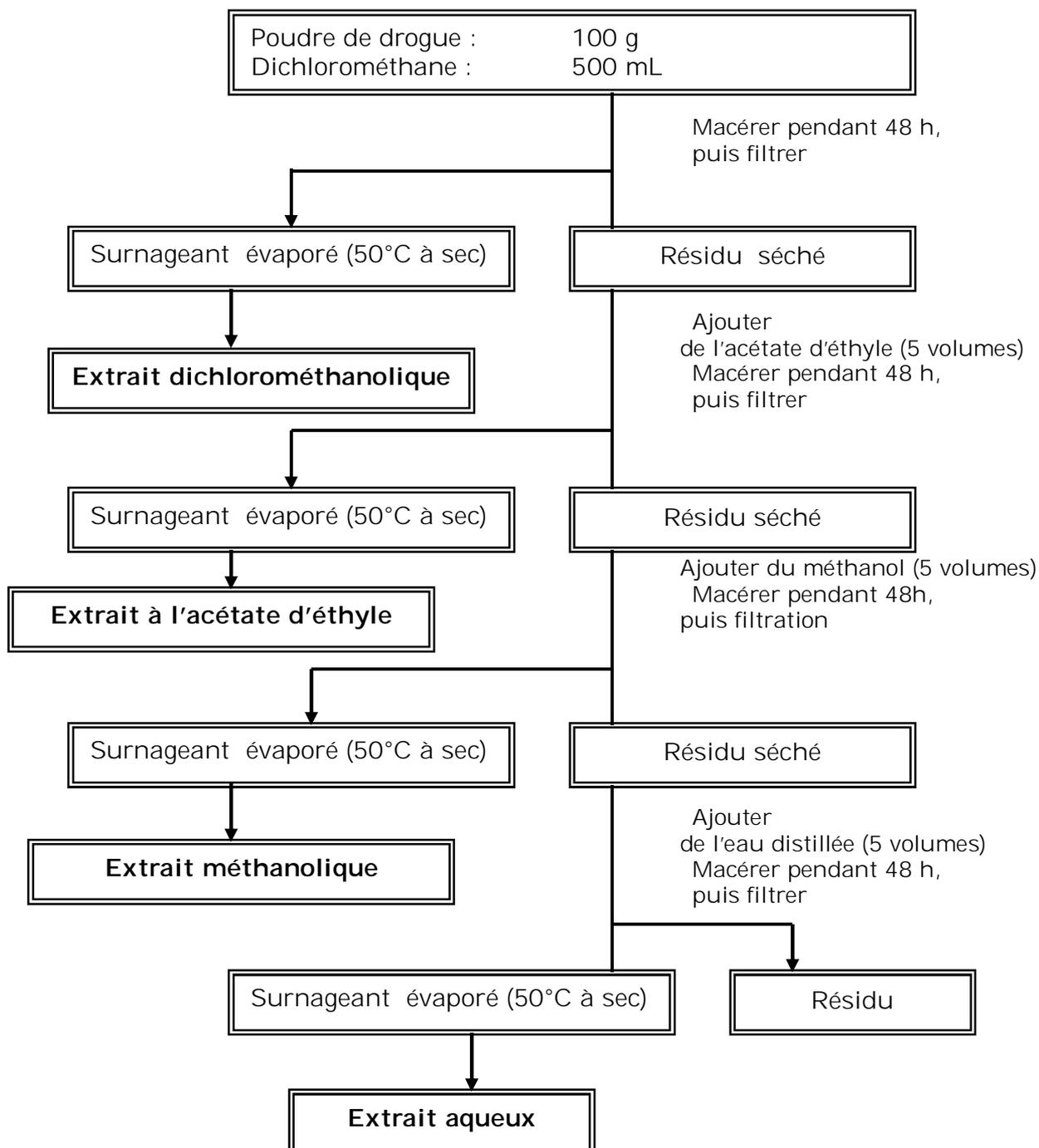


Figure 21 : Extraction par polarités croissantes de solvants

La Figure 21 montre les étapes de l'extraction par polarités croissantes en utilisant successivement le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle, le méthanol et l'eau.

3.2.4. Réalisation des extraits spécifiques

Les extractions spécifiques des dérivés anthracéniques et coumariniques ont été réalisées selon le protocole de Wagner *et al* [1986], celle des mucilages par la méthode décrite par Ibanez *et al* [2006]. Les composés tanniques ont été extraits par la méthode de Thuillier [1970].

3.2.4.1. Extraction spécifique des dérivés anthracéniques

L'extraction spécifique des dérivés anthracéniques a été réalisée à partir de la poudre de drogue dans du méthanol à 50% (Figure 22).

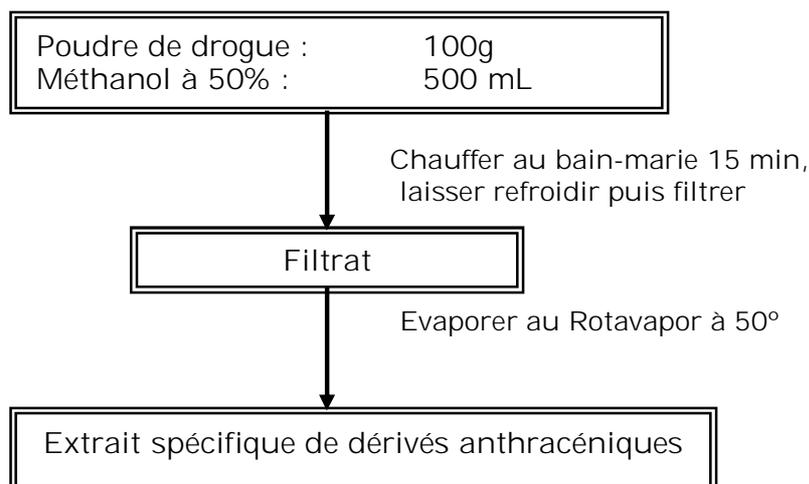


Figure 22 : Protocole d'extraction spécifique des dérivés anthracéniques

3.2.4.2. Extraction spécifique des coumarines

L'extraction spécifique des coumarines a été réalisée à partir de la poudre de drogue dans du méthanol pur (Figure 23).

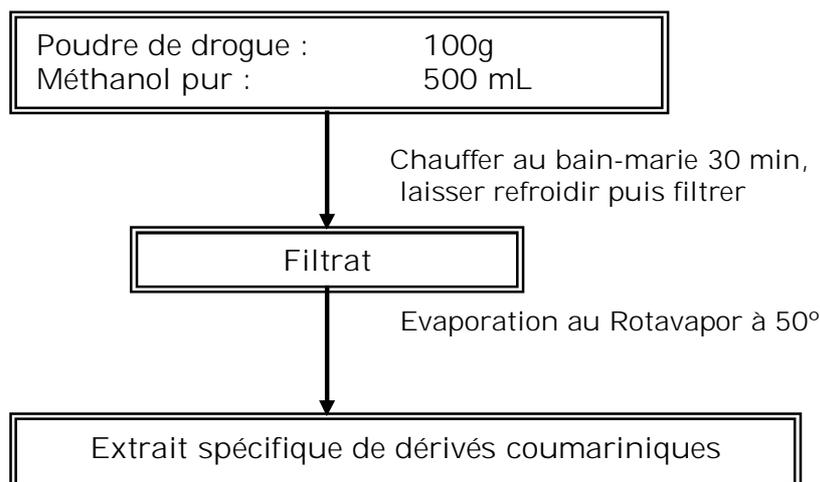


Figure 23 : Protocole d'extraction spécifique des dérivés coumariniques

3.2.4.3. Extraction spécifique des mucilages

On a ajouté à 10 g de poudre de drogue 40 ml d'eau distillée chauffée à 95°C et on a homogénéisé par agitations mécaniques. Cette préparation a été refroidie et maintenue à 8°C pendant 24 h. La solution surnageante a été recueillie et le processus répété 4 fois. Toutes les solutions surnageantes recueillies ont été mélangées puis centrifugées à 6500 tours/min pendant 1 h. Le surnageant clarifié a été mélangé à de l'alcool isopropylique (1,5 volumes d'alcool pour 1 volume de surnageant) pour obtenir un précipité mucilagineux. Les mucilages ont été séchés à 35°C pendant 48 h.

3.2.4.4. Extraction spécifique des tanins

L'extraction spécifique des tanins a été effectuée selon le schéma de la Figure 24. Le protocole est basé sur la précipitation des tanins par la caféine après élimination des substances lipidiques.

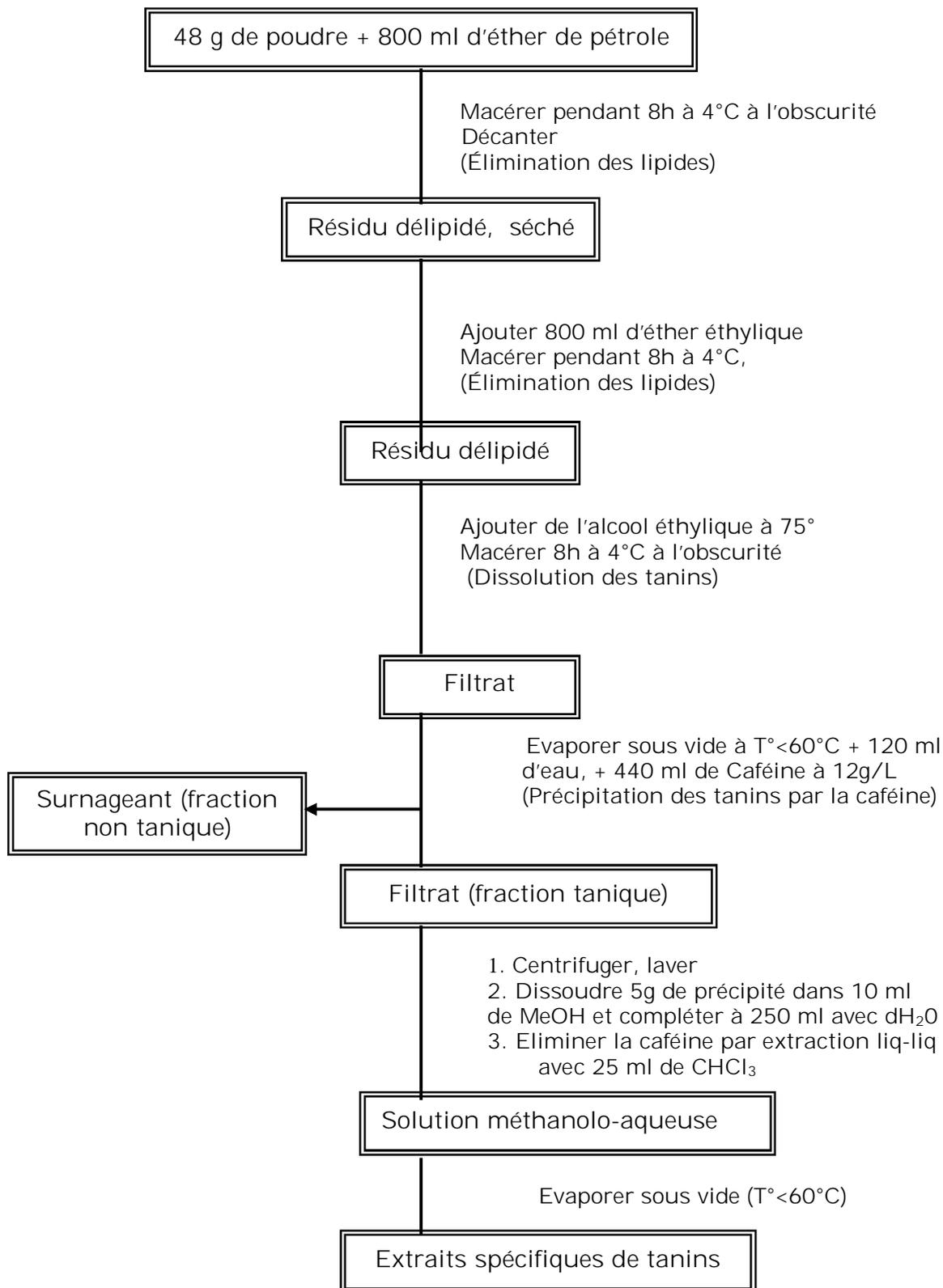


Figure 24: Protocole d'extraction spécifique des tanins

3.3. Détermination de la CMI et de la CMB sur des souches de *E. coli*

3.3.1. Détermination de la CMI

La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) a été déterminée en milieu liquide par la méthode à l'iodonitrotétrazolium (INT) [Eloff J.N., 1998]. Ce substrat chromogène permet de détecter la présence de bactéries par virage du substrat incolore au rose. En effet en phase de croissance active, la déshydrogénase bactérienne catalyse la réduction de l'INT oxydé incolore en INT réduit coloré en rose. Les protons H^+ proviennent du $NADH+H^+$ présent dans le milieu.

Une suspension bactérienne de la souche à tester a été réalisée à partir d'une colonie moyenne dans 5 mL de bouillon Mueller Hinton. Après 2 heures d'incubation à 37°C, elle atteint une concentration d'environ 10^7 bactéries/mL. Une solution mère de l'extrait de plante a été alors réalisée dans de l'eau physiologique stérile.

Dans une plaque de 96 puits on a effectué des dilutions successives de l'extrait de plante. Dans les puits contenant 100 μ L de l'extrait de plante on a ajouté 100 μ L de la suspension bactérienne. Les concentrations finales des extraits ont été : 15; 10; 7,5; 5; 3,75; 2,5; 1,87; 1,25; 0,62; 0,31 et 0,15 mg/mL. Un témoin positif a été réalisé avec la suspension bactérienne et 100 μ L d'eau physiologique.

L'incubation a été faite à 37°C pendant 18 heures, puis on a ajouté dans les puits 40 μ L d'une solution de INT à 0,2 mg/mL pour déterminer la CMI. Après 1 heure d'incubation la lecture a été faite par l'appréciation visuelle du virage du chromogène. La CMI est la plus faible concentration d'extrait de plante pour laquelle on n'observe pas de croissance bactérienne visible (absence de virage au rose).

3.3.2. Détermination de la CMB

Elle a été déterminée par la méthode de Kubo *et al* [2005]. Après la détermination de la CMI, on a effectué une dilution au 1/100 de tous les puits sans croissance bactérienne visible, dans du bouillon Mueller Hinton sans extrait de plantes. Les tubes contenant les dilutions ont été incubés pendant 48 h à 37°C ; puis on a mélangé dans des puits 200 µL du contenu des tubes et 40 µL de la solution d'INT à 0,2 mg/mL. La CMB est la plus faible concentration pour laquelle il y a absence de croissance visible de germes (absence de virage au rose).

CHAPITRE 2 :

RÉSULTATS

1. RÉSULTATS DE L'ANALYSE PAR CCM DES EXTRAITS DES TROIS ORGANES DE *TERMINALIA SUPERBA*

La CCM des extraits spécifiques des dérivés anthracéniques et des coumarines obtenus à partir de la poudre de drogue donne les mêmes résultats que celle réalisée à partir des extraits totaux éthanoliques.

1.1. Détection des dérivés coumariniques

La Figure 25 montre les images des plaques de CCM après la détection des composés coumariniques dans les extraits éthanoliques des trois organes de *Terminalia superba*.

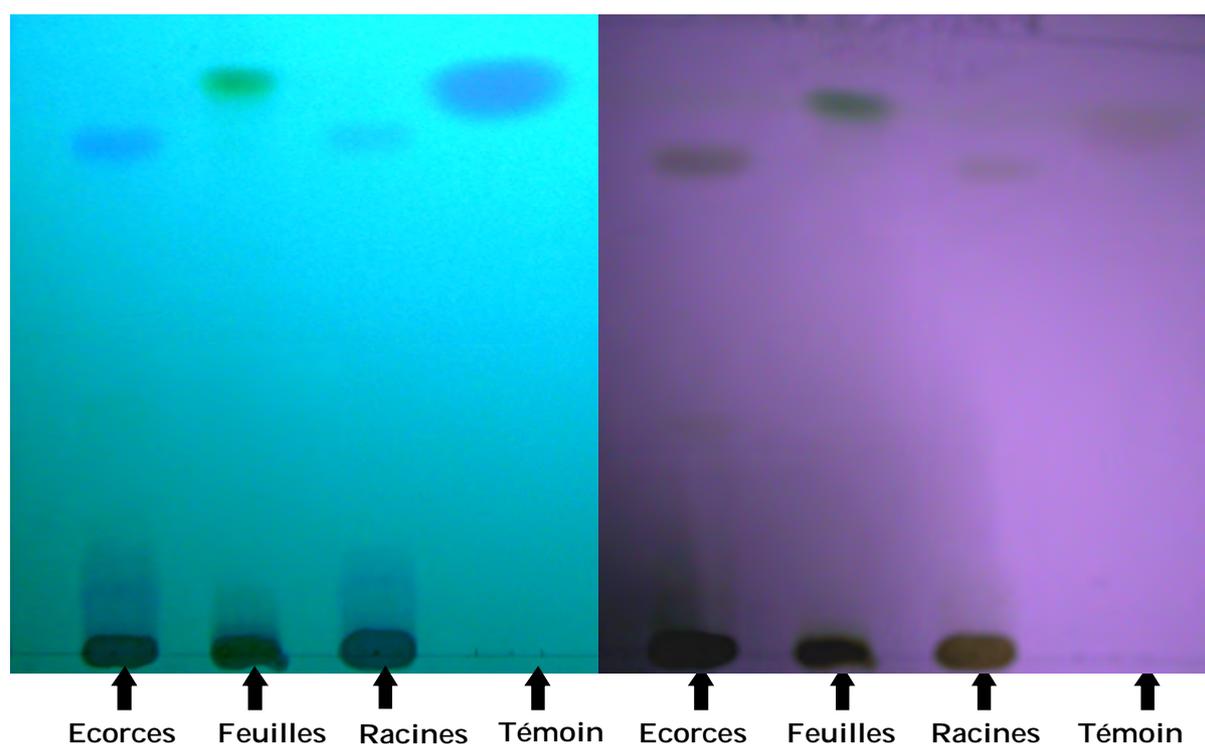


Figure 25 : Détection des composés coumariniques dans les extraits éthanoliques d'écorces, de feuilles et de racines.

A gauche, on observe le chromatogramme à 254 nm et à droite, le chromatogramme après la révélation au KOH dans le visible. Le témoin est le 2H-chromen-2-one.

L'observation à 254 nm et la révélation au KOH montrent la présence de dérivés coumariniques dans les écorces et les racines. Les Rf sont les mêmes pour les deux organes : 0,7 alors que celui du témoin est de 0,75. Les feuilles ne semblent pas receler de dérivés coumariniques. La bande présente au niveau de cet extrait provient de la chlorophylle.

1.2. Détection des dérivés anthracéniques

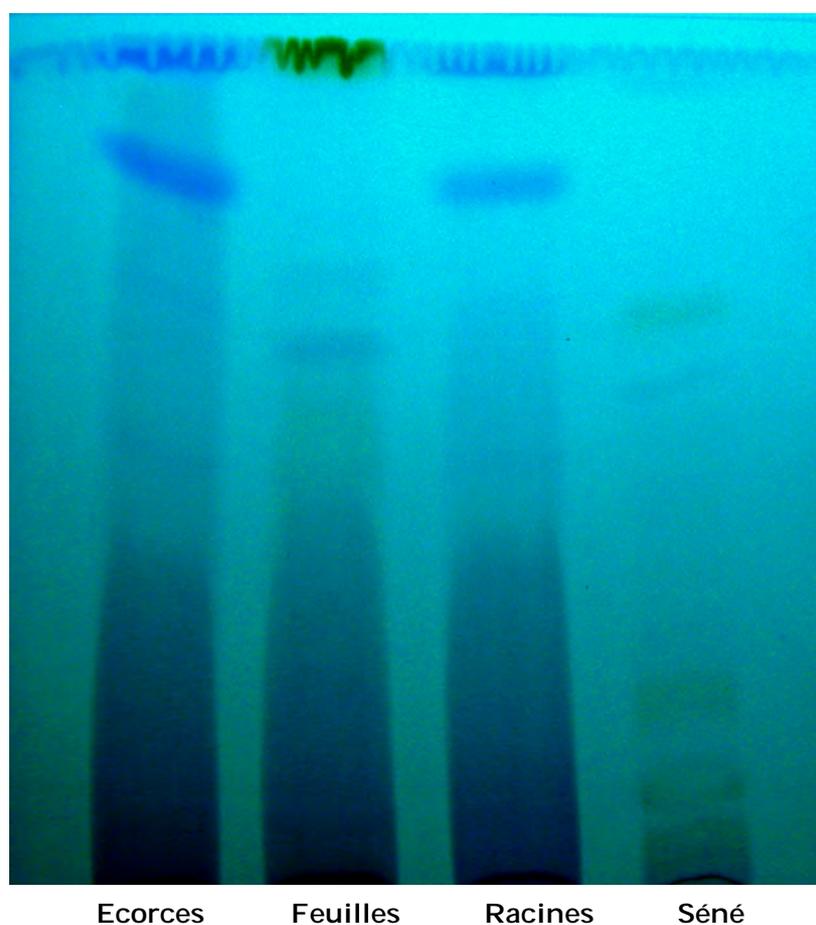


Figure 26 : Détection des composés anthracéniques dans les extraits éthanoliques d'écorces, de feuilles et de racines à 254 nm.

L'extrait de Séné a servi de témoin.

L'analyse révèle la présence de plusieurs composés anthracéniques dans les trois organes de *Terminalia superba*. Le témoin utilisé est l'extrait

de Séné qui contient 4 composés anthracéniques dont les valeurs de Rf sont respectivement 0,27 ; 0,47 ; 0,78 et 0,82. Les feuilles et les racines présentent 3 bandes chacune tandis qu'on en observe 4 dans les extraits d'écorces (Figure 26). Les racines et les écorces semblent contenir deux composés identiques : la bande supérieure et la bande inférieure. Les composés présents dans le témoin ne se retrouvent pas dans les extraits analysés.

2. RENDEMENTS DES DIFFÉRENTES EXTRACTIONS

2.1. Extraits totaux et par polarités croissantes de solvants

Tableau XV: Rendement des extraits totaux (A) et des extraits par polarités croissantes de solvants (B)

Extraits totaux (A)				
	Organes	Feuilles	Ecorces	Racines
Solvants				
Ethanol		7%	14%	4%
Méthanol		-	27%	-
Eau		-	12%	-
Extractions par polarités croissantes de solvants (B)				
Dichlorométhane		9 %	4 %	2 %
Acétate d'éthyle		2 %	3 %	1 %
Méthanol		4 %	12 %	2 %
Eau		2 %	14 %	3 %

Le meilleur rendement des extraits totaux éthanoliques d'écorces, de feuilles et de racines de *Terminalia superba*, est obtenu à partir des écorces (14%). Au regard des rendements obtenus pour les extraits totaux d'écorces, le méthanol semble être le meilleur solvant d'extraction (27%) comparé à un rendement de 12% pour l'eau.

Quant aux extractions par polarités croissantes de solvants, le rendement le plus élevé (14%) est obtenu avec le produit de l'extraction à l'eau des écorces ; le plus faible (1%) est celui de l'acétate d'éthyle à partir des racines. (Tableau XV).

Lors de l'extraction par polarités croissantes de solvants d'écorces de *Terminalia superba*, le méthanol semble avoir des propriétés extractives comparables à celles de l'eau (rendements respectifs de 12% et de 14%). On note également que pour les écorces le rendement de l'extrait total aqueux est proche de celui de l'extrait aqueux obtenu par polarités croissantes de solvants (respectivement 12% et 14%).

2.2. Extraits spécifiques des écorces de *Terminalia superba*

Tableau XVI : Rendement des extraits spécifiques

Extraits spécifiques	Rendement (%)
Coumarines	15
Dérivés anthracéniques	10
Tanins	3
Mucilages	1,2

L'extraction spécifique des écorces de *Terminalia superba* a porté sur quatre classes de composés phytochimiques : les dérivés anthracéniques, les

coumarines, les tanins et les mucilages (Tableau XVI). L'extraction spécifique des mucilages et celle des tanins ont donné les plus faibles rendements (1,2 et 4%).

3. TESTS ANTIBACTÉRIENS AVEC LES EXTRAITS D'ORGANES DE *TERMINALIA SUPERBA*

3.1. Détermination de la CMI sur des souches de *E. coli*

3.1.1. Extraits totaux

Les CMI des extraits totaux éthanoliques des écorces, racines et feuilles de *Terminalia superba* sont déterminées sur deux souches de *E. coli* productrices de bêta-lactamases (une souche non BLSE et une souche productrice de BLSE) et la souche de référence de *E. coli* (Tableau XVII).

La valeur de la CMI de chaque extrait d'organe de plante est la même pour les souches productrices de bêta-lactamases et la souche de référence de *Escherichia coli*. Il n'existe donc pas de différence entre la sensibilité des souches productrices de bêta-lactamases et celle de la souche de référence vis-à-vis des extraits totaux éthanoliques.

Tableau XVII : CMI (mg/mL) des extraits éthanoliques des trois organes de *Terminalia superba*

Souches Organes	Souche	Souche	Souche
	ATCC 25922	non-BLSE	BLSE
Ecorces	1,25	1,25	1,25
Feuilles	3,75	3,75	3,75
Racines	3,75	3,75	3,75

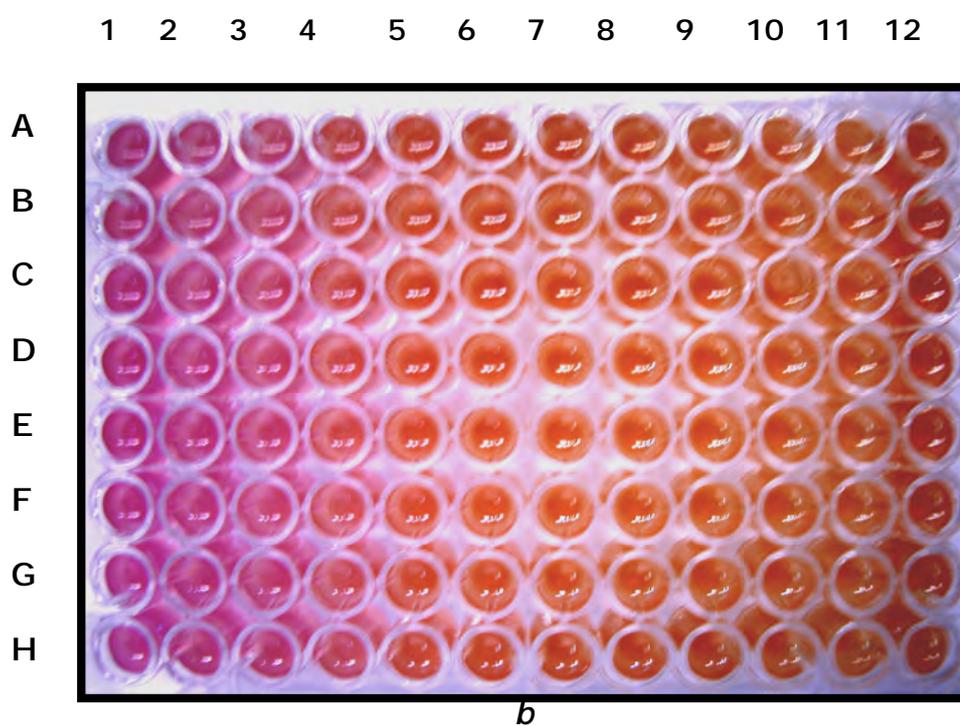
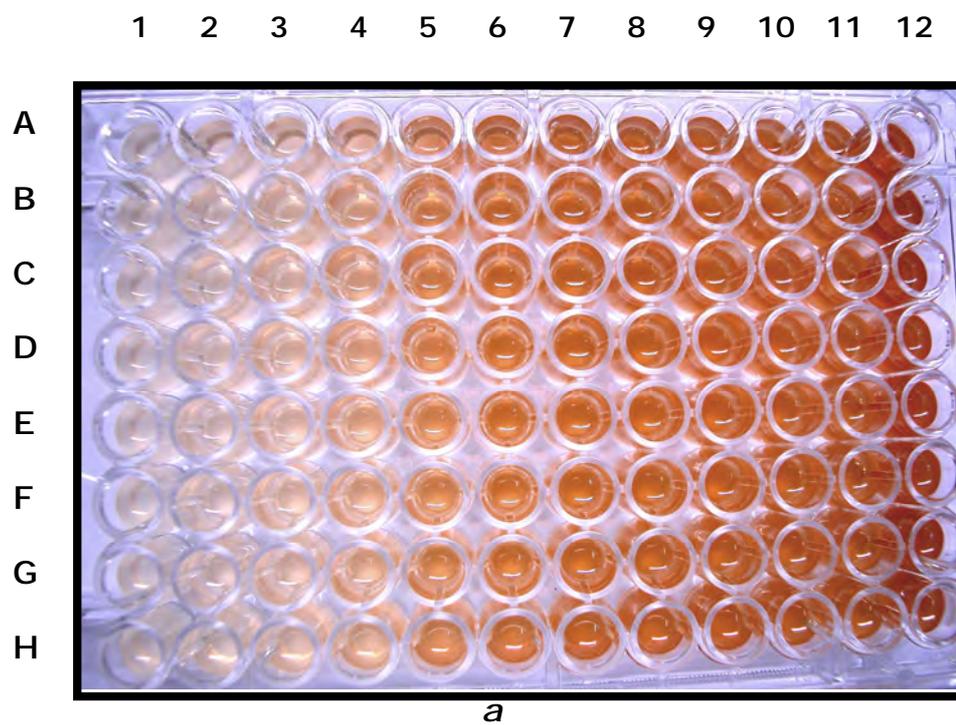


Figure 27: Détermination de la CMI de l'extrait éthanolique d'écorces.
a : plaque avant l'ajout de l'INT. *b* : plaque après la révélation. La rangée 5 représente la CMI (1,25 mg/mL).

La Figure 27 montre la détermination de la CMI de l'extrait éthanolique des écorces de *Terminalia superba* en milieu liquide par la méthode à l'iodonitrotétrazolium (INT). La détermination a été effectuée en triple pour la souche productrice de BLSE (A, B, C), et la souche non BLSE (D, E, F). Une détermination est réalisée en double pour la souche de référence (G,H). Les concentrations de l'extrait varient de 0,15 mg/mL (rangée 2) à 15 mg/mL (rangée 12). La rangée 1 contient la suspension bactérienne sans extrait de plante.

Tableau XVIII : CMI (mg/mL) des extraits méthanoliques et aqueux des écorces de *Terminalia superba*

Souches	Souche	Souche	Souche
Organes	ATCC 25922	non-BLSE	BLSE
Extrait méthanolique	3,75	3,75	5
Extrait aqueux	3,75	3,75	3,75

Les extraits totaux méthanoliques et aqueux des écorces de *Terminalia superba* ont des valeurs de CMI supérieures à celles de l'extrait total éthanolique d'écorces. Pour l'extrait méthanolique on note que la CMI de la souche productrice de BLSE est légèrement supérieure à celle des deux autres souches testées (Tableau XVIII).

3.1.2. Extraits spécifiques

La CMI la plus basse, obtenue pour les extraits totaux éthanoliques d'écorces, nous a orientés vers le choix de ce matériel pour la réalisation des extraits spécifiques.

Les CMI déterminées sur les extraits spécifiques coumariniques et anthracéniques d'écorces de *Terminalia superba* ont des valeurs identiques

pour les trois souches de *E. coli* (3,75 mg/mL). Les mucilages et les tanins ont des CMI plus élevées (> 10 mg/ml) (Tableau XIX).

Tableau XIX : CMI (mg/mL) des extraits spécifiques d'écorces de *Terminalia superba* sur les trois souches de *E. coli*

Souches Extraits	Souche	Souche	Souche
	ATCC 25922	non-BLSE	BLSE
Dérivés anthracéniques	3,75	3,75	3,75
Coumarines	3,75	3,75	3,75
Tanins	> 10	> 10	> 10
Mucilages	> 10	> 10	> 10

3.1.3. Extraits par polarités croissantes de solvants

Tableau XX : Les CMI (mg/mL) des extraits par polarités croissantes de solvants sur la souche de *E. coli* productrice de BLSE

Solvant Extrait	Dichloro- méthane	Acétate d'éthyle	Méthanol	Eau
	Écorces	7,5	3,75	7,5
Racines	15	7,5	3,75	> 15
Feuilles	15	7,5	7,5	> 15

Les extraits d'écorces à l'acétate d'éthyle et de racines au méthanol ont les plus faibles valeurs de CMI : 3,75 mg/mL. Les extraits aqueux des trois organes ont des CMI supérieures à 15 mg/mL (Tableau XIX).

3.2. DÉTERMINATION DE LA CMB DE L'EXTRAIT ÉTHANOLIQUE D'ÉCORCES SUR UNE SOUCHE DE *E. COLI*

La valeur de la CMB déterminée sur la souche de *E. coli* productrice de BLSE est de 3,75 mg/mL. Le rapport CMB/CMI est de 3, suggérant une action bactéricide de l'extrait total éthanolique d'écorces de *Terminalia superba* sur *Escherichia coli*, à condition que cette concentration puisse être atteinte facilement dans le sang d'un malade [Berche *et al*, 1989].

CHAPITRE 3 :

DISCUSSION

Nos résultats obtenus lors du criblage phytochimique, à partir de poudres d'écorces, de racines, et de feuilles de *Terminalia superba* ont montré la présence de tanins galliques et catéchiques ainsi que celle de dérivés anthracéniques. En plus, des mucilages ont été mis en évidence dans les écorces et les feuilles tandis que des coumarines ont été détectées dans les écorces et les racines de cette plante (Tableau IX, page 90).

Ces résultats ont été confirmés par l'analyse sur CCM pour la détection des dérivés anthracéniques et des coumarines. En effet, des composés anthracéniques ont été mis en évidence dans les trois organes tandis que les coumarines ont été révélées dans les écorces et les racines.

Les données de la littérature révèlent la présence de plusieurs composés phytochimiques dans les extraits d'organes de *Terminalia superba*. L'extrait brut d'écorces de *Terminalia superba* obtenu par le mélange méthanol/chlorure de méthylène (1:1) contient de l'acide gallique, l'acide ellagique et leurs dérivés, des stérols (stigmastérol et β -sitostérol) [Wansi *et al*, 2007]. La présence d'alcaloïdes a été signalée par Burkill *et al* [1985]. Cependant nos analyses n'ont pas montré la présence de cette classe de composés. Cette différence peut s'expliquer par la faible sensibilité du criblage phytochimique utilisé dans notre étude. De plus, des variations de la composition phytochimique sont liées au lieu de récolte ainsi qu'à la période de récolte des espèces végétales. A l'instar de plusieurs espèces végétales rencontrées en zones tropicales, *Terminalia superba* contient des tanins (essentiellement des tanins catéchiques) [Doat, 1978]. Il contient également des gommés polysaccharidiques riches en acides uroniques et en oses. [Anderson *et al*, 1974].

La composition phytochimique de cette plante (coumarines, dérivés anthracéniques et tanins) confirme son usage ethnopharmacologique dans des maladies infectieuses. En effet, ces composés sont responsables des propriétés antibactériennes rapportées chez diverses plantes médicinales.

Au regard des rendements obtenus pour les extraits totaux d'écorces, de feuilles et de racines de *Terminalia superba*, le méthanol semble être le

meilleur solvant d'extraction (27%) comparé à un rendement de 12% pour l'eau. Lors de l'extraction par polarités croissantes de solvants d'écorces de *Terminalia superba*, le méthanol semble avoir des propriétés extractives comparables à celles de l'eau (rendements respectifs de 12% et de 14%). Cependant le rendement ne saurait en aucun cas présager, ni de la concentration des molécules actives dans les extraits obtenus avec chaque solvant, ni de leur activité antibactérienne.

Les CMI des extraits totaux éthanoliques des écorces, racines et feuilles de *Terminalia superba* sont déterminées sur deux souches de *E. coli* productrices de bêta-lactamases (une souche non BLSE et une souche productrice de BLSE) et la souche de référence de *E. coli* (Tableau XVII).

La valeur de la CMI de chaque extrait d'organes de plantes est la même pour les souches productrices de bêta-lactamases et la souche de référence de *Escherichia coli*. Il n'existe donc pas de différence de sensibilité entre les souches productrices de bêta-lactamases et la souche de référence vis-à-vis des extraits totaux éthanoliques. Donc la résistance significative de la souche BLSE et non BLSE concerne des antibiotiques autres que les principes actifs que recèle *Terminalia superba*. Il importe donc d'éviter une utilisation abusive de ces principes actifs afin de préserver leur activité antibactérienne.

Certains auteurs rapportent une tendance à une moindre sensibilité aux extraits de plantes des souches multirésistantes aux antibiotiques usuels [Nascimento *et al*, 2000]. Ces extraits de plantes pourraient contenir des principes actifs antibiotiques de structures apparentées aux antibiotiques commerciaux utilisés (résistance croisée). Dans ce contexte, concernant *Terminalia superba*, il pourrait s'agir de nouvelles molécules sur le plan structural.

La plus faible valeur de CMI (1,25 mg/mL) est celle de l'extrait éthanolique d'écorces de *Terminalia superba*. Ainsi le meilleur rendement

lors de la réalisation des extraits éthanoliques d'écorces est corrélé à la plus forte action inhibitrice sur la croissance de *Escherichia coli*.

Les extraits totaux éthanoliques de feuilles et de racines, malgré leurs compositions phytochimiques différentes ont la même CMI de 3,75 mg/mL sur les trois souches. En effet ces deux extraits contiennent des tanins et des dérivés anthracéniques. Les mucilages sont présents dans les feuilles et les coumarines ont été détectées dans les racines.

Les CMI relativement plus élevées obtenues pour les extraits spécifiques d'écorces de *Terminalia superba* par rapport aux extraits totaux éthanoliques témoignent d'un pouvoir inhibiteur atténué chez les dérivés coumariniques et anthracéniques (CMI = 3,75 mg/ml). Concernant les extraits spécifiques des tanins et des mucilages, on pourrait évoquer une absence d'effet synergique entre ces dérivés se trouvant hors des extraits totaux éthanoliques d'écorces.

La comparaison des CMI des extraits totaux éthanoliques, des extraits par polarités croissantes de solvants et des extraits spécifiques (coumarines, tanins, anthracènes et mucilages) montre que l'éthanol est le solvant qui extrait le mieux des écorces, les molécules à action inhibitrice sur la croissance des souches de *E. coli* productrices de bêta-lactamases et la souche de référence (CMI=1,25mg/ml).

Il faut souligner que la forme d'administration des phytomédicaments est généralement la macération dans l'alcool fabriqué traditionnellement ainsi que des décoctés et infusions. L'utilisation de l'extrait total éthanolique pour les tests antibactériens se rapproche donc de ces conditions. La plus faible CMI est obtenue pour l'extrait total éthanolique d'écorces ; ceci conforte le choix de ce solvant pour l'extraction des composés phytochimiques à activité antibactérienne de *Terminalia superba*.

La plupart des travaux réalisés sur *Terminalia superba*, concernent surtout l'exploitation du bois comme matière première. Ainsi de nombreux travaux ont été effectués sur la teneur en tanins, les caractéristiques

déterminant la qualité du bois, sa conservation, sa protection vis-à-vis des parasites.

Sur la base de son utilisation par certaines populations ouest-africaines (les Sotho du sud Sénégal par exemple) dans le traitement du diabète, des chercheurs ont exploré son action hypoglycémiante. Deux composés inhibiteurs de l' α -glucosidase ont été isolés de l'extrait du mélange méthanol/chlorure de méthylène [Wansi *et al*, 2007].

La littérature rapporte l'usage ethnopharmacologique de *Terminalia superba* (Combretaceae) dans le traitement de maladies infectieuses et parasitaires. Ce sont surtout les écorces qui sont employées ; seules ou en association elles servent à soigner les affections broncho-pulmonaires [Akoegninou *et al*, 2006]. Les écorces sont également utilisées dans le traitement de la blennorragie et de la diarrhée [Neuwinger, 2000]. La tisane d'écorces est anti-dysentérique. On l'administre aussi aux femmes stériles, menacées de fausses-couches ou à celles qui présentent des troubles ovariens [Berhaut, 1974]. La pulpe de feuilles est employée en bains de bouche contre les gingivites et les aphtes [Berhaut, 1974 ; Neuwinger, 2000]. Elle est aussi utilisée contre les rhumatismes, les œdèmes, la toux et l'angine. Le suc des feuilles soigne la conjonctivite [Neuwinger, 2000].

On note donc une abondance des résultats relatifs aux données ethnopharmacologiques. Cependant, à notre connaissance, Les propriétés antibactériennes de *Terminalia superba* n'ont jamais été analysées.

CONCLUSION

En préalable à la détermination de l'activité antibactérienne des plantes de la pharmacopée africaine, nous avons procédé à la caractérisation de 2 souches de *E. coli*. Ces 2 souches se sont révélées productrices de bêta-lactamases sur la base de leur activité hydrolysante sur la benzylpénicilline. La détermination de leur phénotype de résistance a permis de distinguer une souche de *E. coli* non BLSE et une souche de *E. coli* BLSE. Une autre méthode d'isolement, de purification et de caractérisation utilisée en ingénierie des protéines, la chromatofocalisation a permis d'isoler la BLSE et la non BLSE en une seule entité moléculaire chacune, de pHi respectifs 6,4 et 5,4. Enfin, la PCR réalisée sur ces deux souches a permis de les identifier comme des souches bla_{TEM}. Il faut souligner que le recours à trois différentes méthodes (microbiologique, biochimique et de la biologie moléculaire), complémentaires et concordantes nous a facilité la réalisation de notre premier objectif : la caractérisation de souches de *E. coli* productrices de bêta-lactamases.

Un accent particulier a été mis sur la souche BLSE qui inhibe la plupart des familles d'antibiotiques commercialisés : bêta-lactamines (y compris les céphalosporines de troisième et quatrième génération), aminosides, tétracyclines, quinolones, sulfamides, nitrofuranes. Au cours de cette étude, 7 espèces végétales ont inhibé totalement cette souche multirésistante aux antibiotiques commercialisés. L'étendue du spectre d'action antibiotique de 4 espèces végétales choisies parmi les 7 susmentionnées a été évaluée et confirmée par leur efficacité in vitro sur 30 souches bactériennes résistantes aux bêta-lactamines par production de bêta-lactamase. Ces données ont permis de mettre en relief l'intérêt de la médecine traditionnelle à travers l'utilisation thérapeutique des plantes médicinales et la nécessité de valoriser ces plantes par l'étude scientifique.

Terminalia superba (Combretaceae), dans notre étude est l'espèce végétale dont le spectre d'action sur les souches résistantes aux bêta-lactamines est le plus étendu. L'objectif de réaliser son étude phytochimique s'est imposé à nous, car à notre connaissance, aucune donnée de la littérature basée sur une étude scientifique ne fait état de propriétés

antibactériennes de *Terminalia superba*. L'étude phytochimique a permis d'identifier des coumarines, des dérivés anthracéniques, des mucilages et des tanins dans les extraits éthanoliques d'écorces de *Terminalia superba*. De toutes ces familles phytochimiques nous n'avons pas pu identifier laquelle serait le meilleur inhibiteur de la croissance des souches de *E. coli*. Néanmoins, la comparaison des CMI des extraits spécifiques et de l'extrait total éthanolique de *Terminalia superba* nous a permis d'entrevoir le mécanisme d'action antibiotique probable qui résulterait d'une synergie entre les différents principes actifs présents dans la plante. Cette synergie consisterait en une inhibition préalable de la bêta-lactamase sécrétée par la souche bactérienne suivie d'une action antibiotique stricto sensu.

En somme, il faut souligner un acquis important à l'issue de cette étude, c'est l'identification et la mise en évidence d'inhibiteurs de bêta-lactamase au sein de plusieurs espèces végétales africaines dont *Terminalia Superba* (Combretaceae). Ces inhibiteurs pourraient être proposés comme alternative en industrie pharmaceutique pour résoudre le problème crucial et sans cesse accru de la multirésistance des germes aux antibiotiques commercialisés.

Nous envisageons de poursuivre les travaux par la purification complète de la bêta-lactamase en vue de mieux préciser ses propriétés physico-chimiques. Par ailleurs le séquençage des gènes et l'évaluation de l'aptitude des souches productrices de BLSE à transmettre les gènes de résistance à d'autres souches nous permettront d'approfondir l'étude de leurs caractéristiques génétiques. En ce qui concerne l'étude phytochimique, l'isolement et l'identification des principes actifs de *Terminalia. superba* responsables de cette action inhibitrice synergique seront effectués. Il est important de réaliser l'étude des effets pharmacologiques et toxiques de ces principes actifs ainsi que leur éventuelle action antibactérienne sur d'autres micro-organismes (staphylocoques, streptocoques).

RÉFÉRENCES

- 1 . **Adekunle AA, Ikumapayi AM.**, Antifungal property and phytochemical screening of the crude extracts of *Funtumia elastica* and *Mallotus oppositifolius*.(2006); West Indian Med J.**55 (4)**:219-23.
- 2 . **Adeneye A.A., Ajagbonna O.P.,Mojiminiyi F.B.O., Odigie I.P.,Ojobor P.D.,Etarrh R.R.,Adeneye A.K.**, The hypotensive mechanisms for the aqueous stem bark extract of *Musanga cecropioides* in Sprague-Dawley rats. (2006); Journal of ethnopharmacology.**106**:203-207
- 3 . **Adewunmi C.O., Agbedahunsi J. M., Adebajo A. C., Aladesanmi A. J., Murphy N., Wando J.**, Ethno-veterinary medicine: screening of Nigerian medicinal plants for trypanocidal properties. (2001); Journal of ethnopharmacology. **77(1)**:19-24.
- 4 . **Adjanohoun E. J., Adjakidje V., Ake-Assi M.R.A., Akouegninou L., Zohoun Th., d'Almeida A. et Coll.**, Médecine traditionnelle et pharmacopée. Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques en République Populaire du Bénin. (1989); Edition ACCT, Paris .
- 5 . **Adomi P.O.**, Antibacterial activity of aqueous and ethanol extracts of the stem bark of *Alstonia boonei* and *Morinda lucida*. (2006); Scientific Research and Essays.**1(2)**:050-053.
- 6 . **Ahoyo A.T., Baba-Moussa L., Anago A.E., Avogbe P., Missihoun T.D., Loko F., Prévost G., Sanni A., Dramane K.**, Incidence d'infections liées à *Escherichia coli* producteur de bêta-lactamase à spectre élargi au centre hospitalier départemental du Zou et Collines au Bénin.(2007);Médecine et maladies infectieuses. 746-752.
- 7 . **Akinpelu D.A., Olorunmola F.O.**, Antimicrobial activity of *Bridelia ferruginea* fruit. (2000); Fitoterapia **71(1)**:75-76.
- 8 . **Akinsulire O. R., Aibinu I. E., Adenipekun T., Adelowotan T., Odugbemi T.**, In vitro antimicrobial activity of crude extracts from plants *Bryophyllum pinnatum* sp and *Kalanchoe crenata* sp. (2007); African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines. **4 (3)**:338-344.
- 9 . **Akoegninou A.,Van der Burg W.J., Van der Maesen L.J.G.**, Flore analytique du Bénin. (2006); Edition Wageningen University Papers 0602 ; **1** : 624-631.

- 10 . **Ali A., Shamsuzzaman A.**, Isolation and characterization of antibacterial constituents from the bark of *Psidium guajava*. (1996); Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research 31(2): 133-139.
- 11 . **Ambler R. P.**, The structure of β -lactamases. (1980); Phil. Trans. R.Soc. Lond. Biol. **289**:321-331.
- 12 . **Anderson D. M.W, Bell P. C.**, Composition and properties of the gum exudates from *Terminalia seria* and *Terminalia superba*.(1974); Phytochemistry; **13** : 1871-1874.
- 13 . **Akram M., Shahid M., Khan A.U.**, Etiology and antibiotic resistance patterns of community acquired urinary tracts infections in JNMC hospital Aligarh , India. (2007); Annals of clinical microbiology and antimicrobials. 6:4. doi:10.1186/1476-0711-6-4.
- 14 . **Apak L , Olila D.**, The in-vitro antibacterial activity of *Annona senegalensis*, *Securidacca longipendiculata* and *Steganotaenia araliacea*. (2006); Ugandan medicinal plants. Afr.Health Sci. **6(1)**:31-35.
- 15 . **Aqil F., M. Sajjad A. Khan M.S.A., Owais M., Ahmad I. Dr.**, Effect of certain bioactive plant extracts on clinical isolates of β -lactamase producing methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. (2005); Journal of Basic Microbiology. **45(2)**:106-114.
- 16 . **Avril J. L., Dabernat H., Denis F., Monteil H.**, Bactériologie clinique 2^e édition, (1989) ; Edition *Ellipse*, Paris.
- 17 . **Bauernfeind A., and Horl G.**, Novel R-factor-borne β -lactamase conferring resistance to cephalosporins. Infection (1987);**15**:257-259.
- 18 . **Bae J-H.**, Antimicrobial effect of *Fraxinus rhynchophylla* extracts on food-borne pathogens. (2004); Han'gug mi'saengmul saengmyeong gong haghoeji. . **32 (3)**: 277-281.
- 19 . **Balaka B., Bonkuongou P., Squalli M., Bambara M., Millogo A., Agbèrè A.D.**, Analyse comparative des méningites bactériennes néonatales à Lomé, Bobo-Dioulasso, Casablanca et Lyon. (2004) ; Bull Soc Pathol Exot. 97(2) : 131-134.

- 20 . **Bean D. C., Krahe D., Wareham D.W.**, Antimicrobial resistance in community and nosocomial *Escherichia coli* urinary tract isolates. (2008); *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 7: 13.
- 21 . **Berche P., Gaillard J.L., Simonet M.**, Bactéries des infections humaines, (1989); Edition *Flammarion Médecine-Sciences*, Paris.
- 22 . **Berhaut J.**, Flore illustrée du Sénégal , (1974); *Edition Maisonneuve* , Paris.
- 23 . **Bert F., Juvin M., Ould-Hocine Z., Clarebout G., Keller E., Lambert N., Arlet G.**, Evaluation and Updating of the Osiris Expert System for Identification of *Escherichia coli* β -Lactam Resistance Phenotypes. (2005); *J. Clin. Microbiol.* **43(4)**: 1846–1850.
- 24 . **Biradar Y.S., Jagatap S., Khandelwal K. R., Singhania S.**, Exploring of Antimicrobial Activity of Triphala Mashi—an Ayurvedic Formulation. (2007); *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine.* doi: 10.1093/ecam/nem002.
- 25 . **Blomberg B., Jureen R., Manji K.P., Tamim B. S., Mwakagile D.S.M., Urassa W.k., Fataki M., Msangi V., Tellevik M.G., Maselle S.Y., Langeland N.**, High rate of fatal cases of pediatric septicaemia caused by Gram-negative Bacteria with extended-spectrum beta-lactamases in Dar-es-Salaam, Tanzania. (2005); *J Clin Microbiol.* **43(2)** :745-749.
- 26 . **Bonnet R.**, Growing Group of Extended-Spectrum β -Lactamases: the CTX-M Enzymes. (2004); *Antimicrob Agents Chemother.* **48(1)**: 1–14.
- 27 . **Bonnet, R., J.L.M. Sampaio, C. Chanal, D. Sirot, C.D. Champs, J.L. Viallard, R. Labia, Sirot J.**, A novel class A extended-spectrum β -lactamase (BES-1) in *Serratia marcescens* isolated in Brazil.(2000); *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**: 3061-3068.
- 28 . **Bonomo R., Rice L. B.**, Inhibitor resistant class A beta-lactamases.(1999); *Frontiers in Bioscience.* 4:34-41.
- 29 . **Bou G., Cartelle M., Tomas M., Canle D., Molina F., Moure R., Eiros J. M. Guerrero A.**, Identification and Broad Dissemination of the CTX-M-14 β -Lactamase in Different *Escherichia coli* Strains in the Northwest Area of Spain. (2002); *J. Clin Microbiol.* **40(11)**:4030-4036.

- 30 . **Boyom F.F., Nguouana V., Zollo P.H., Menut C., Bessiere J.M., Git J., rosenthal P.J.**, Composition and anti-plasmodial activities of essential oils from some cameroonian medicinal plants. (2003); *Phytochemistry*. **(64)**: 1269-1275.
- 31 . **Bradford P.A.**, Extended spectrum β lactamases in the 21st Century: Characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. (2001); *Clinical Microbiology Reviews*. 933-951.
- 32 . **Briggs S., Ussher J., Taylor S.**, Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* at Middlemore Hospital.(2005); *Journal of the New Zealand Medical Association*.**118**:1218
- 33 . **Brisson-Noel A., Trieu-Cuot P., Sougakoff W., Courvallin P.**, Aspects actuels de la résistance bactérienne aux antibiotiques. (1989); *Ann. Biol. Clin.* 47:98-101.
- 34 . **Bruneton J.** Pharmacognosie, Phytochimie – Plantes Médicinales. (1989); Edition *Tech & Doc*; Paris. p. 233-267.
- 35 . **Burkill H. M.**, The useful Plants of West Tropical Africa. (1985); Royal Botanic Gardens Edition; Kew. **1**: 425-426
- 36 . **Bush K, Jacoby G A, Medeiros A A.**, A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure.(1995); *Antimicrob Agents Chemother.* **39(6)**:1211–1233.
- 37 . **Calbo E., Romani V., Xercavins M., Gomez L., Garcia Vidal C., Quintana S., Vila J., Garau J.**, Risk factors for community-onset urinary tract infections due to *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum β -lactamases. (2006); *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* **57(4)**: 780-783.
- 38 . **Cao, V. T. B., Lambert T., Courvalin P.**, Characterization of ColE1-like plasmid pIP843 from *Klebsiella pneumoniae* encoding extended-spectrum β -lactamase CTX-M-17. (2002); *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:1212-1217.
- 39 . **Chabbert Y. A.**, Techniques en Bactériologie. (1972); Edition *Flammarion Médecine-Sciences*, Paris.
- 40 . **Chang F-Y., Siu L. K., Huang M-H., Ho M.**, Gene evolution in northern Taiwan: two novel β -lactamases, SHV-25 and SHV-26. (2001); *Antimicrob. Agents Chemother.* **45(9)**: 2407-2413

- 41 . **Chowdhury A. A., Islam M. S.**, Antimicrobial activity of *Trema orientalis*. (2004). Dhaka University Journal of Pharmaceutical Sciences. Short communication. **3**: 1-2
- 42 . **Chukwujekwu J.C., van Staden J., Smith P.**, Antibacterial, anti-inflammatory and antimalarial activities of some Nigerian medicinal plants. (2005); South African Journal of Botany. **71(3-4)**: 316-325.
- 43 . **Coates J. N., Gilpin L. M., Gwynn M. N., Lewis D. E., Milner P. H., Tyler J. W.**, SB-202742, a novel beta-lactamase inhibitor isolated from *Spondias mombin*. (1994); Journal of Natural Products. **57(5)**: 654-657
- 44 . **Cockerill F.R.III**, Genetic Methods for Assessing Antimicrobial Resistance, (1999); Antimicrob Agents Chemother. **43(2)**: 199–212.
- 45 . **Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie**, Communiqué 2004. Société Française de Microbiologie. (2004) ; Paris, France <http://www.sfm.asso.fr/>.
- 46 . **Courvallin P., Goldsein F., Philippon A., Sirot J.**, L'Antibiogramme. (1985); Edition *MPC-VIDEON*, Paris.
- 47 . **Cowan M. M.**, Plant Products as Antimicrobial Agents.(1999); Clin Microbiol Rev. **12(4)**: 564–582.
- 48 . **Daniel M.**, Medicinal plants : Chemistry and properties. Science Publishers (2005); Enfield, New Hampshire, USA. p192-193.
- 49 . **Dano G., Arima H.**, Antibacterial flavonoid glycosides from guava. (2004); Jpn. Kokai Tokyo Koho , (Pokka Corp., Japan).
- 50 . **Datta N. Kontomichalou P.**, Penicillase synthesis controlled by infectious R factors in Enterobacteriaceae. (1965); Nature. **208** :239-244.
- 51 . **Daza R., Gutierrez J., Piedrola J.**, Antibiotic susceptibility of bacterial strains isolated from patients with community-acquired urinary tract infections. (2001); Int. J. Antimicrob. Agents **18**: 211 – 215.
- 52 . **Delinska-Galinska A., Kurlenda J., Kozielska E., Borkowska A., Luczak G., Nazar K.**, Prevalence of ESBL strains in urinary tract infections in children in 1996 and 2004. (2006); Przegl Epidemiol. **60(1)**:59-64.

- 53 . Dimo T., Laurent F., Rakotonirina S. V., Tan, P. V., Kamtchouing P., Dongo E., Cros G.**, Methanol extract of *Terminalia superba* induces endothelium-independent relaxation of rat thoracic aorta. (2006); *Pharmazie* **61(5)**: 470-473. Publisher: Govi-Verlag Pharmazeutischer Verlag GmbH.
- 54 .Djikpo-Tchibozo M.**, Évaluation de la qualité hygiénique-Étude phytochimique et pharmacologique de quelques plantes de la médecine traditionnelle béninoise.(2004);Thèse unique. Faculté des Sciences de l'Université de Lomé. Spécialité Pharmacologie/Microbiologie. p.119, 127.
- 55 . Doat J.**, Les tanins dans les bois tropicaux. (1978); *Bois et Forêts des Tropiques*. **182**: 37-54.
- 56 . Dongmo A.B., Kamanyi A., Franck U., Wagner H.**, Vasodilating properties of extracts from the leaves of *Musanga cecropioides* (R. Brown).(2002); *Phytother. Res.***16**:6-9
- 57 . Donnenberg M.**, *Escherichia coli* virulence mechanisms of versatile pathogen. (2002); Elsevier Science *Ed* , San Diego California.
- 58 . Drlica K, Zhao X L.**, DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. (1997); *Microbiol Rev.* **61**:377–392.
- 59 . Dromigny J.A., Nabeth P.,Juergens-Behr A., Perrier-Gros J.D.**, Risk factor for antibiotic-resistant *Escherichia coli* isolated from community-acquired urinary tract infections in Dakar, Sénégal. (2005); *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **56**:236-239.
- 60 . Ekouya A., Itoua B. G., Ouabonzi A., Ouamba J.-M.**, Isolement du gallate de méthyle et évaluation de l'activité antibactérienne et antitumorale de quelques extraits de *Klainedoxa gabonensis* Pierre ex Engl. (2006); *Phytothérapie*.**4(3)** :117-120.
- 61 . Escobar-Paramo P., Grenet K., Le Menac'h A., Rode L., Salgado E., Amorin C., Gouriou S., Picard B., Rahimy M. C., Andremont A., Denamur E., Ruimy R.**, Large-scale population structure of human commensal *Escherichia coli* isolates. (2004); *Appl Environ Microbiol.* **70**:5698-5700.
- 62 . Euzéby J.P.**, Abrégé de Bactériologie générale et médicale à l'usage des étudiants de l'école Nationale Vétérinaire de Toulouse 2006. www.bacteriologie.net/generale/

- 63 . **Elkhatat E.S., Ibrahim .R., Aziz M.A.**, Portulene, a new diterpene from *Portulaca oleracea* L.(2008); J Asian Nat Prod Res. **10(11)**:1039-43.
- 64 . **Eloff J.N.**, a sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plants extracts for bacteria. (1998); *Planta med.* **64(8)**:711-3.
- 65 . **Eyquem A., Alouf J., Montagnier L.**, Traité de microbiologie clinique. (2000); Edition *Piccin*, Spa, Italy.
- 66 . **Fakeye T. O., Itiola O. A., Odelola H. A.**, Evaluation of the antimicrobial property of the stem barks of *Picralima nitida* (Apocynaceae). (2000); *Phytother. Res.* **14(5)**:368-370.
- 67 . **Fang H., Lundberg C., Olsson-Lijequist B., Hedin G., Lindbäck, Rosenberg A., Struwe J.**, Molecular epidemiological analysis of *Escherichia coli* Isolates producing extended-spectrum β lactamases for identification of nosocomial outbreaks in Stockolm, Sweden. (2004); J Clin Microbiol. **42(12)**:5917-5920.
- 68 . **Fauchère J.L., Avril J. L.**, Bactériologie médicale. (2002); Edition *Ellipses*, Paris. pp. 141-151.
- 69 . **Fauchère J.L.**, Bactério-Fiches, (1990); Editions *Ellipse*, Paris.
- 70 . **Ferron A.**, Bactériologie médicale 15^e éd.,(1992); Edition *C et R.*, Paris.
- 71 . **Flandrois J.P.**, Bactériologie médicale. (1997); *Presses Universitaires de Lyon*.
- 72 . **Fluit A. C., Visser M.R., Schmitz F.J.**, Molecular Detection of Antimicrobial Resistance. (2001); *Clin Microbiol Rev.* **14 (4)**:836-871
- 73 . **Gangoué-Piéboji J., Baurin S.,Frère J-M., Ngassam P.,Ngameni B.,Azebaze A., Pngnyemb D. E., Watvhueng J., Goffin C., Galleni M.**, Screening of some medicinal plants from Cameroon for beta-lactamase inhibitory activity. (2007); *Phytother Res.* **15**:1722-1939
- 74 . **Gangoué-Piéboji J., Bedenic B., Koulla-Shiro S., Randegger C., Adiogo D., Ngassam P., Ndumbe P., Hächler H.**, Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* in Yaounde, Cameroon, (2005); J. Clin Microbiol. **43(7)**: 3273–3277.

- 75 . **Gaudy C., Buxeraud J.**, Antibiotiques : Pharmacologie et thérapeutique. (2005); *Elsevier Masson Publisher*. Paris Cedex 15. pp 21-30.
- 76 . **Goldstein F. W., and the Multicenter Study Group**, Antibiotic susceptibility of bacterial strains isolated from patients with community-acquired urinary tract infections in France. (2000); *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.***19** :112-117.
- 77 . **Heffernan H., Woodhouse R., Blackmore T.**, Prevalence of extended-spectrum β -lactamases among urinary *E. coli* and *Klebsiella* in New Zealand in 2006.(2006); *Environmental Science and Research (ESR)*, Porirua. FW 06107. p 7.
- 78 . **Heritage J., M'Zali F. H, Gascoyne-Binzi D., Hawkey P.M**, Evolution and spread of SHV extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria. (1999); *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **44**: 309-318
- 79 . **Houghton P. J., Raman A.**, Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts, (1998); *Thomson Publishing* , first edition. p 154-162.
- 80 . **Huang G.J., Lai H.C., Chang Y.S., Sheu M.J., Lu T.L., Huang S.S., Lin Y.H**, Antimicrobial, dehydroascorbate reductase, and monodehydroascorbate reductase activities of defensin from sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam. 'Tainong 57'] storage roots. (2008); *J Agric Food Chem.* **56(9)**:2989-95
- 81 . **Hyle E.P., Lipworth A.D., Zaoutis T., Nachamkin I., Fishman N. O., Bilker W. B., Mao X., Lautenbach E.**, Risk factors for increasing multidrug resistance among extended spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species. (2005); *Clin Infect. Dis.* **40 (9)**:1317-1324.
- 82 . **Ibanez M., Ferrero C.**, Extraction and Characterization of the hydrocolloid from *Prosopis flexuosa* DC Seeds. (2003); *Food Research International.* **36**:455-460.
- 83 . **Ibrahim M.A., Nwude N., Ogunsusi R.A., Aliu Y.O.**, (1984); Screening West African plants for anthelmintic activity. *ILCA Bull.* 17: 19–23
- 84 . **Jacoby G A, Han P.** Detection of extended –spectrum β –lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. (1996); *J Clin Microbiol.* **34**:908–911.

- 85 . Jarlier V., Nicolas M.H., Fournier G. and Philipon A.**, Extended broad-spectrum β lactamases conferring transferable resistance to newer β lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility pattern. (1988); Rev. Infect. Dis. **10**:867-878.
- 86 . Jimenez-Valera M., Ruiz-Bravo A., Ramos-Cormenzana,** Inhibition of β -lactamases from *Yersinia enterocolitica* by plants extract.(1987); Journal of Antimicrobial Chemotherapy.**19**:31-37.
- 87 . Kabore Z. I ., Guissou I.P ., Sourabie S ., Gnagoa G.**, Etude antibactérienne in vitro d'extraits alcaloidiques de *Holarrhena floribunda*, vis-à-vis de *Escherichia coli* entéropathogène sérotype O127 . (1998) ; Edition Pharma. Méd. Tra. Afri. **10** :13-26
- 88 . Kamtchouing P., Kahpui S M., Dzeufiet P-D.D., Tedong L., Asongalem E.A., and Dimo T.**, Anti-diabetic activity of methanol/methylene chloride stem bark extracts of *Terminalia superba* and *Canarium schweinfurthii* on streptozotocin-induced diabetic rats. (2006); Journal of ethnopharmacology. **104 (3)**: 306-309.
- 89 . Kerharo J., Adam J.G.**, La pharmacopée sénégalaise traditionnelle. (1974); Editions Vigot, Paris.
- 90 . Knothe H., Shah P., Krcmery V., Antal M. , Mitsuhashi S.** Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. (1983); Infection **11** :315–17.
- 91 . Knowles J. R.**, Penicillin resistance : the chemistry of β lactamase inhibition. (1985); Acc Chem Res **28** :97-104.
- 92 . Koshimizu K., Daito H., Kaji M. , Sakaki M.**, 3-Hydroxyuridine from *Baillonella toxisperma* as phytohormone and herbicide. (1987); (Sumitomo Chemical Co., Ltd., Japan). Jpn. Kokai Tokkyo Koho 5 pp.
- 93 . Korten V., Ulusoy S., Zarakolu P., Mete B.**, Antibiotic resistance surveillance over a 4-year period (2000-2003) in Turkey: results of the MYSTIC Program. (2007); Diagn Microbiol Infect Dis. 17888609.

- 94 . Kothari A., Sagar V.,** Antibiotic resistance in pathogens causing community-acquired urinary tract infections in India: a multicenter study.(2008); *Journal Infect Developing Countries.* **2(5)**:354-358.
- 95 . Koudou J., Abena A .A., Ngaissona P., Bessiere J. M.** Chemical composition and pharmacological activity of essential oil of *Canarium schweinfurthii*. (2005); *Fitoterapia* 76(7-8) : 700-703.
- 96 . Kubmarawa D., Ajoku G., Onigbanjo H. O. , Okorie D. A.** Antimicrobial activity of the essential oil of the leaves of *Boswellia dalzielii* Hutch.(2005); Department of Chemistry, Federal University of Technology, Yola, Nigeria. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants* **8(1)**: 107-109.
- 97 . Kubo I., Fujita K., Lee S. H., Ha T. J.,** Antibacterial activity of polygodial. (2005); *Phytother. Res.* **19**: 1013-1017.
- 98 . Kuete V., Wabo G.F., Ngameni B., Mbaveng A.T., Metuno R., Etoa, F.X., Ngadjuji B.T., BengV.P., Meyer J.J.M., Lall N.,** Antimicrobial activity of the methanolic extract, fractions and compounds from the stem bark of *Irvingia gabonensis* (Ixonanthaceae). (2007); *J. Ethnopharmacol.* **114 (1)**:54-60.
- 99 . le Grand A., Wondergem P. A., Verpoorte R., Poussel J.L.,** Anti-infectious phytotherapies of the tree-savannah of Senegal (West-Africa).Antimicrobial activity of 33 species. (1988); *J. ethnopharmacol.* **22 (1)**: 25-31.
- 100 . Laine C., Baniakina J., Vaquette J., Chaumont J.-P., Simeray J.,** Antifungal activity of the barks of trunks of seven phanerogams from the Congo. (1985); *Plantes médicinales et Phytothérapie.* **1952(2)** :75-83.
- 101 . Liang W-L., Huang H-M., Lin R-D., Hou W.C.,** Screening for natural inhibitors of penicillinase by copolymerization of hydrolyzed starch or glycogen in sodium dodecylsulfate polyacrylamide gels for detecting penicillinase activity. (2003); *Bot. Bull. Acad. Sin.* **44**: 187-191.
- 102 . Linscott A.J., Brown W. J.,** Evaluation of four commercially available extended-spectrum beta–lactamase phenotypic confirmation tests.(2005); *J. Clin. Microbiol.* **43(3)**:1081-1085.
- 103 . Livermore M. D.,** β -Lactamases in laboratory and clinical resistance. (1995); *Clin Microbiol Rev.* **8**:557–584.

- 104** . Lobo de Araujo A., Radvanvi E., Determination of phospholipase A2 activity by a colorimetric assay using a pH indicator. (1987); *Toxicon*. **25(11)**:1181-1188.
- 105** . Lomberg H., Hanson L. A., Jacobson B., Jodal U., Leffler H., Svanborg C., Correlation of blood group, vesicoureteral reflux and attachment in patients with recurrent pyelonephritis. (1984); *New. Engl. Med*, **408**: 1189-1192.
- 106** . Lopes M. G., De Vasconcelos N.M.S., Almeida M.B., Nogueira C. M. D., De Morais N. M. T., De Sa M. J. H. C., Analytical characterization of medicinal plants. (1998) ; *Revista Brasileira de Farmacia* **79(3/4)** : 88-89.
- 107** . Luzzaro F., Mezzatesta M., Mugnaioli C., Perilli M., Stefani S., Amicosante G., Rossolini G.M., Toniolo A., Trends in production of extended spectrum β -lactamases among enterobacteria of medical interest: report of the second Italian national survey.(2006); *Journal of clinical Microbiology*. **44 (5)**:1659-1664.
- 108** . Ma L., Alba J., Chang F-Y., Ishiguro M., Yamaguchi K., Siu L.K., Ishii Y., Novel SHV-Derived Extended-Spectrum β -Lactamase, SHV-57, That Confers Resistance to Ceftazidime but Not Cefazolin.(2005); *Antimicrob Agents Chemother*. **49(2)**: 600–605.
- 109** . Macfoy C.A., Cline E.I, Antibacterial activities of three plants used in traditional medicine in Sierra Leone. (1990); **28(3)**:327-7.
- 110** . Matthew M., Harris A.M., Marshall M.J., Ross G.W., The use of analytical isoelectric focusing for detection and identification of β -lactamase.(1975) ; *J. Gen. Microbiol*. **88**: 169-178.
- 111** . Moris-Varas F. , Shah A. , Aikens J. , Nadkarni N. P. , Rozzel J. D. , Demirjian D. C., Visualization of enzyme-catalyzed reactions using pH indicators: rapid screening of hydrolase libraries and estimation of the enantioselectivity. (1999); *Bioorg Med Chem*. **7 (10)** : 2183-8.
- 112** . Morosini M.I, Canton R, Martinez-Beltran J, Negri M C, Perez-Diaz J C, Baquero F, Blazquez J., New extended spectrum TEM-type β -lactamase from *Salmonella enterica* subsp. *enterica* isolated in a nosocomial outbreak.(1995); *Antimicrob Agents Chemother*. **39**:458–461.

- 113** . **Morris D., O'Hare C., Glennon M., Maher M., Corbett-Feeney G., Cormican M.,** Extended-of Plant Use and Applications. (2000); Editions *Medpharm Scientific Publishers*, Stuttgart.
- 114** . **Naas T, Philippon L, Poirel L, Ronco E, Nordman P.,** An SHV-derived extended-spectrum β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. (1999); *Antimicrob Agents Chemother.* **43**:1281–1284.
- 115** . **Nascimento G.F., Locatelli J., Freitas P.C., Silva G.L.,** Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. (2000); *Brazilian Journal of Microbiology.* **31**:247-256.
- 116** . **National Committee for Clinical Laboratory Standards,** Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7–A5 and informational supplement M100–S10.(2002); Wayne, Pa: National Committee for Clinical Laboratory Standards.
- 117** . **National Committee for Clinical Laboratory Standards,** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 9th informational supplement.(1999); M100-S9. Wayne, Pa: National Committee for Clinical Laboratory Standards.
- 118** . **Ndugulile F., Juree R., Harthug S., Urassa W., Langeland N.,** Extended-spectrum β -lactamases among Gram-negative bacteria of nosocomial origin from an intensive care unit of a tertiary health facility in Tanzania. (2005); *BMC Infect Dis.* **5**:86-93.
- 119** . **Ndukwe C.K.,Okeke I.N., Lamikanra A., Adesina S.K.,** Antibacterial activity of aqueous extracts of selected chewing sticks.(2005); *The Journal of contemporary dental practice.*6(3):1-8.
- 120** . **Neal M.,** *Pharmacologie médicale.* (2003); Edition *de Boeck Université.* Bruxelles. p 80.
- 121** . **Neuwinger H.D.,** *African Traditional Medicine: A Dictionary of Plant Use and Applications.* (2000); Editions *Medpharm Scientific Publishers*, Stuttgart.
- 122** . **Nkere C. K., Iroegbu C. U.,** Antibacterial screening of the root, seed and stem bark extracts of *Picralima nitida*. (2005); *African Journal of Biotechnology.* **4 (6)** : 522-526.

- 123** . **Moulin M., Coquerel A.**, Pharmacologie, (2002) ; Editions *Masson*, Paris. pp 163-192.
- 124** - **Nkere C. K., Iroegbu C. U.**, Antibacterial screening of the root, seed and stem bark extracts of *Picralima nitida*. (2005); African Journal of Biotechnology. **4 (6)** : 522-526.
- 125** . **Nwinyi F.C., Binda L., Ajoku G.A., Aniagu S.O., Enwerem N.M., Orisadipe A., Kubarawa D. , Gamaniel K.S.**, Evaluation of the aqueous extract of *Boswellia dalzielii* stem bark for antimicrobial activities and gastrointestinal effects. (2004); African Journal of Biotechnology. **3(5)**: 284-288.
- 126** . **Olanlokun J.O., David O. M.**, Antibacterial activity of partitioned methanolic extract of *Alstonia boonei* (De Wild) against some medically important pathogens. (2007); Biosciences, Biotechnology Research Asia. **4(1)**:135-139.
- 127** . **Olonitola O. S., Olayinka, A. T., Inabo H. I., Shaibu A. M.**, Production of extended spectrum beta-lactamases of urinary isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Ahmadu Bello University Teaching Hospital, Zaria, Nigeria. (2007); International Journal of Biological and Chemical Sciences. **1(2)**:181-185.
- 128** . **Olive D. M., Bean P.**, Principles and Applications of Methods for DNA-Based Typing of Microbial Organisms, (1999); J Clin Microbiol. **37(6)**: 1661–1669.
- 129** . **Oteo J., Lazaro E., de Abajo F.J., Faquero F., Campos I.**, Antimicrobial-resistant invasive *Escherichia coli*. (2005); Emerg. Infect Dis. **11**: 546-553
- 130** . **Ouellette M, Paul G C, Philippon A M, Roy P H.**, Oligonucleotide probes (TEM-1, OXA-1) versus isoelectric focusing in β -lactamase characterization of 114 resistant strains. (1988); Antimicrob Agents Chemother. **32**:397–399.
- 131** . **Pagani L., Dell'Amico E., Migliavacca R., D'Andrea M.M., Giacobone E., Amicosante G., Romero E., Rossolini G. M.**, Multiple CTX-M-Type Extended-Spectrum β -Lactamases in Nosocomial Isolates of *Enterobacteriaceae* from a Hospital in Northern Italy. (2003); J Clin Microbiol. **41(9)**: 4264 –4269.

- 132** . Paterson D.L., Bonomo R. A., Extended-Spectrum β -Lactamases: a Clinical Update. (2005); Clin Microbiol Rev. **18(4)**: 657–686.
- 133** . Pegnyemb D. E., Ghogomou R.T., Sondergam B.L., Minor alkaloids from the seeds of *Voacanga africana*. Fitoterapia (1999); **70(4)**: 446-448.
- 134** . Perilli M, Segatore B, Massis M R D, Riccio M L, Bianchi C, Zollo A, Rossolini G M, Amicosante G., TEM-72, a new extended-spectrum β -lactamase detected in *Proteus mirabilis* and *Morganella morganii* in Italy. (2000); Antimicrob Agents Chemother. **44**:2537–2539.
- 135** . Pitout J. D. D., Thomson K.S., Hanson N. D., Ehrhardt A. F., Moland E. S., Sanders C.C., β -lactamases responsible for resistance to expanded-spectrum cephalosporins in *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis* isolates recovered in South Africa.(1998); Antimicrob Agents Chemother. **42(6)**:1350-1354.
- 136** . Poole K., Resistance to beta-lactam antibiotics. (2004); Cell. Mol. Life Sci., 61(17): 2200-2223. Review.
- 137** . Rabe T. , van Staden J., Antibacterial activity of South African plants used for medicinal purposes. (1997); Journal of ethnopharmacology. **56**: 81-87.
- 138** . Ramurafhi T.E., Antibacterial activities and phytochemical studies of suluense *Combretum collinum* and *Calpurnia aurea*. MRC South Africa, Research Day 2007.
- 139** . Reading C., Cole M., Clavulanic acid: a beta-lactamase inhibiting beta-lactam from *Streptomyces clavuligerus*. (1977); Antimicrob. Agents Chemother. **11**: 852-857.
- 140** . Renner U., Vobasine and voacryptine, two new alkaloids from *Voacanga africana*. (1959); Geigy Akt-Ges, Basel, Switz. Experantia **15**:185-6
- 141** . Richmond M. H, Sykes R. B., The β -lactamases of Gram-negative bacteria and their possible physiological role. (1973); Advances in Microbial Physiology. Rose, A. H. & Tempest D. W., Eds.. Academic Press, London. pp. 31–88
- 142** . Rivera de Leon M., Panlilio B. G., Bamba, E. M., Bognot F. L., Dizon D. S., Antibacterial properties of local medicinal plants against selected test

organisms. (2001); Abstracts of Papers, 222nd ACS National Meeting, Chicago, IL, United States, August 26-30, 2001.

- 143 . Robert-Demuet S.**, Antibiotiques et antibiogrammes.(1995); *Editions Vigot*, Ville Mont-Royal. pp.35,100.
- 144 . Rodriguez-Bano J., Navarro M. D., Romero L., Martinez-Martinez L., Muniain M. A., Perea E. J., Perez-Cano R., Alvaro P.**, Epidemiology and clinical features of infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in non-hospitalized patients.(2004); *Journal of Clinical Microbiology*. 1089-1094.
- 145 . Rojas J.J., Ochoa V.J., Saul A Ocampo S. A., Muñoz J.F.**, Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: A possible alternative in the treatment of non-nosocomial infections.(2006); *BMC Complementary and Alternative Medecine*. doi:10.1186/1472-6882-6-2.
- 146 . Rosenthal E.J.**, Epidemiology of septicaemia pathogens. (2002); *Dtsch. Med Wochenschr.* **127(46)**:2435-40.
- 147 . Samuni A.**, A direct spectrophometric assay and determination of Michaelis-constants for the β -lactamase reaction.(1975); *Anal. Biochem.* **63**:17-26.
- 148 . Sanofi Diagnostics.** L'antibiogramme en diffusion. (1998); Communiqué du Comité de L'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.
- 149 . Shahverdi A.R., Iranshahi M., Mirjani R., Jamalifar H., Amin G., Shafiee A.**, Bioassay-guided isolation and identification of an antibacterial compound from *Ferula persica* var. *Persica* roots. (2005); *DARU, Journal of Faculty of Pharmacy Tehran University of Medical Sciences.* 13(1):17-19.
- 150 . Singleton P.**, Bactériologie. (1994); *Editions Masson*, Issy les Moulineaux Cedex.
- 151 . de Souza C., Koumaglo K., Gbeassor M.**, Evaluation des propriétés antimicrobiennes des extraits aqueux totaux de quelques plantes médicinales. (1995); *Edition Pharma. Méd. Tra. Afr.* 10: 103-112.

- 152 . **Syre R.B.**, Methods for detecting β lactmases, (1981); D.S. Reeves Edition, Livingstone; pp. 64-89.
- 153 . **Talla E., Djamen D., Djouldé D., Tatsadeu L., Tantoh D., Mbafor J. T., Fomum Z. T.**, Antimicrobial activity of *Bridelia ferruginea* leaves extracts. (2002); Fitoterapia **73 (4)**:343-5.
- 154 . **Tenover F C, Arbeit R D, Goering R V.**, How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. (1997); Infect Control Hosp Epidemiol. **18**:426–39.
155. **Tenover F.C., Raney P. M., Williams P. P., Rasheed J. K., Biddle J. W., Olivier A., Fridkin S. K., Jevitt L., McGowan J. E. Jr**, Evaluation of the NCCLS extended spectrum β -lactamase confirmation methods for *Escherichia coli* with isolates collected during project ICARE. (2003); J. Clin. Microbiol. 3142–3146.
- 156 . **Thuillier Y., Michel P.**, Nouveau procédé d'obtention d'un principe actif hypertenseur de l'Anarcadium occidentale L.(1970). Brevet N°34608, Grande Bretagne.
- 157 . **Tona L., Kambu K., Ngimbi N., Cimanga K., Vlietinck A. J.**, Antiamoebic and phytochemical screening of some Congolese medicinal plants. (1998); Journal of ethnopharmacology. **61(1)** : 57-65.
- 158 . **Tona L., Kambu K., Mesia K., Cimanga K., Apers S.,; De Bruyne T., Pieters L.,Totte J., Vlietinck A.J.**, Biological screening of traditional preparations from some medicinal plants used as antidiarrhoeal in Kinshasa, Congo. (1999); Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology **6(1)** :59-66.
- 159 . **Van der Watt E., Pretorius J.C.**, Purification and identification of active antibacterial components in *Caprobrotus edulis* L. (2001);. J. Ethnopharmacol.;**76(1)** :87-91.
- 160 . **van Vuuren S.F., Viljoen A.M.**, The in vitro antimicrobial activity of toothbrush sticks used in Ethiopia.(2006);South African Journal of Botany. 4(72):646-648.

- 161** . **Venkatesan G.K., Krishnan K.**, Antimicrobial activity of saponin fractions of the leaves of *Gymnema sylvestre* and *Eclipta prostrate*.(2007);World Journal of Microbiology and Biotechnology.24(11):2737-3740 .
- 162** . **Wagner H., Bladt S.** Plant Drug Analysis. (1996); Edition *Springer*, Munich;1: 125-146.
- 163** . **Walker R.A., Sillans R.** Les plantes utiles du Gabon. (1995).; Ed *Sepia*.
- 164** . **Wansi J.D., Lallemand M-C., Chiozem D. D., Toze F.A.A, Mbaze L. M., Naharkhan S.,; Iqbal M. C., Tillequin F., Wandji J., Fomum Z. T,** α -Glucosidase inhibitory constituents from stem bark of *Terminalia superba* (Combretaceae). (2007); *Phytochemistry (Elsevier)* **68(15)**:2096-2100.
- 165** . **Watt C., Louie M., Simor A. E.**, Evaluation of Stability of Cefotaxime (30- μ g) and Ceftazidime (30- μ g) Disks Impregnated with Clavulanic Acid (10 μ g) for Detection of Extended-Spectrum β -Lactamases. (2000); *J Clin Microbiol.* **38(7)**: 2796–2797.
- 166** . **Williams B. L., Wilson K.**, A biologist's guide to Principles and Techniques of Pratical Biochemistry.(1981);Second edition. *Edward Arnold Publishers*, London.
- 167** . **Yu Y., Zhou W., Chen Y.,Ding Y., Ma Y.**, Epidemiological and antibiotic resistant study on extended-spectrum β -lactamase–producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Zhejiang province. (2002); *Chinese Medical Journal*, **115(10)**:1479-1482.
- 168** . **Yu Z., Pan J., Zhou H.M.**, A direct continuous pH-spectrophotometric assay for arginine kinase activity. (2002); *Protein Pept Lett.* **9 (6)**: 545-552.
- 169** . **Zeba B., Kiendrébéogo M., Lamien A., Docquier J-D.,Simpore J., Nacoulma O.G.**, Major enzymatic factors involved in bacterial penicillin resistance in Burkina-Faso. (2007); *Pakistan Journal of Biological Sciences.* **10(3)**:506-510.

RÉSUMÉ

Au cours de cette étude les propriétés antibactériennes d'extraits totaux éthanoliques de 38 plantes médicinales africaines ont été testées sur des souches de *Escherichia coli* (*E. coli*) productrices de bêta-lactamases à spectre élargi (BLSE) et non BLSE. L'analyse par PCR de l'ADN de ces souches isolées d'infections urinaires a révélé la présence de gènes de bêta-lactamases de type TEM.

Onze extraits de plantes ont inhibé totalement la croissance d'une souche non BLSE. Huit extraits de plantes ont exercé une inhibition de 100% sur la croissance d'une souche BLSE. Parmi ces plantes, *Terminalia superba* inhibe à 100% la croissance de 30 souches de *Escherichia coli* productrices de bêta-lactamases. La concentration minimale inhibitrice (CMI) la plus faible (1,25 mg/mL) est obtenue pour les extraits d'écorces de *Terminalia superba*.

Le screening phytochimique par chromatographie sur couche mince a révélé la présence de tanins, de mucilages, de dérivés coumariniques et anthracéniques dans cette plante.

L'inhibition par les extraits de plantes de l'activité hydrolasique des bêta-lactamases sur le substrat benzylpénicilline a été évaluée à 578 nm par une méthode spectrophotométrique. L'extrait éthanolique d'écorces de *Terminalia superba* a inhibé à 98% la non BLSE et à 81% la BLSE extraites de *Escherichia coli*. Les pHi déterminés par chromatofocalisation sont de 5,4 pour la non BLSE et 6,4 pour la BLSE.

Les résultats obtenus suggèrent la présence dans l'extrait éthanolique d'écorces de *Terminalia superba*, d'inhibiteurs de bêta-lactamases associés à l'action de substances inhibitrices de la croissance des souches de *Escherichia coli*.

Mots clés : *Terminalia superba*, activité antibactérienne, *Escherichia coli*, inhibiteur de bêta-lactamase.

ABSTRACT

During this study, the ethanolic extracts of 38 african ethnomedicinal plants were screened for antibacterial activities against extended spectrum beta-lactamase (ESBL) and non-ESBL producing *Escherichia coli* (*E. coli*) strains. The PCR analysis of the DNA from these *E. coli* strains isolated by urinary tract infections revealed the presence of type TEM beta-lactamases genes.

The growth of a non ESBL *E. coli* strain is totally inhibited by 11 plants extracts. 8 plants extracts showed 100% inhibition of the growth of an ESBL producing *E. coli* strain. Among these botanical species, *Terminalia superba* inhibited totally the growth of 30 beta-lactamases producing *E. coli* strains.

The ethanolic stem barks extract of *Terminalia superba* showed the lowest MIC (Minimum Inhibitory Concentration) (1,25 mg/mL). The phytochemical screening of extracts by TLC (Thin Layer Chromatography) revealed that this plant contained tannins, mucilage, coumarin and anthracen derivatives.

The plants extracts were tested for their ability to inhibit the hydrolysis of benzylpenicillin by beta-lactamases using a spectrophotometric assay at 578 nm. The ethanolic stem barks extract of *Terminalia superba* showed high inhibition of the tested beta-lactamases (98 % for the non ESBL and 81 % for the ESBL). The pHi values determined by chromatofocusing were 5,4 for the non ESBL and 6,4 for the ESBL.

These results suggest that *Terminalia superba* contains inhibitors of beta-lactamases as well as inhibitors of the growth of *E. coli* strains.

Keys words: *Terminalia superba*, antibacterial activity, *Escherichia coli*, beta-lactamase inhibitor.

ANNEXES

ANNEXE 1 : DÉFINITIONS

Intégron : Groupe de gènes et d'autres séquences d'ADN qui permettent aux plasmides de capturer les gènes d'autres plasmides [Brown T.A., (2002); *Génomes. Edition Médecine-Sciences Flammarion*; Paris. p 531].

Plasmide : Le plasmide est de l'ADN généralement circulaire, souvent trouvé dans les bactéries et d'autres types de cellules [Brown T.A. *Génomes. (2002); Edition Médecine-Sciences Flammarion*; Paris. p 539].

Pays en voie de développement : pays dont l'économie n'a pas atteint le niveau de l'Amérique du Nord, de l'Europe occidentale etc... (euphémisme créé pour remplacer sous-développé) [Le Petit Robert, dictionnaire alphabétique et analogique de la langue française. (1987); 107, avenue Parmentier, Paris-XI^e. p 529].

Transposon : Élément génétique qui peut se déplacer d'un endroit à un autre dans une molécule d'ADN [Brown T.A., *Génomes. (2002); Edition Médecine-Sciences Flammarion*; Paris. p 549].

ANNEXE 2 : LIEU DE RÉCOLTE DES ESPÈCES VÉGÉTALES UTILISÉES

1. Plantes récoltées sur le territoire béninois

N°	Nom et Famille	Organe utilisé	Lieu de récolte
1	<i>Aloe barteri</i> (Aloeaceae)	Feuilles	Porto-Novo
2	<i>Alstonia boonei</i> (Apocynaceae)	Feuilles, écorces	Abomey-Calavi
3	<i>Annona senegalensis</i> (Annonaceae)	Feuilles	Porto-Novo
4	<i>Boswellia dalzielii</i> (Burseraceae)	Écorces	Savè
5	<i>Bridelia ferrugineae</i> (Euphorbiaceae)	Feuilles	Abomey-Calavi
6	<i>Caloncoba welwitschii</i> (Flacourtiaceae)	Ecorces	Porto-Novo
7	<i>Carapa procera</i> (Meliaceae)	Fruits	Avrankou
8	<i>Canarium schweinfurthii</i> (Burseraceae)	Écorces	Pobè
9	<i>Ceiba pentandra</i> (Bombacaceae)	Ecorces	Abomey-Calavi
10	<i>Clausena anisata</i> (Rutaceae)	Feuilles, tiges	Abomey-Calavi
11	<i>Cnestis ferruginea</i> (Connaraceae)	Feuilles	Abomey-Calavi
12	<i>Combretum collinum</i> (Combretaceae)	Feuilles	Dassa
13	<i>Ficus exasperata</i> (Moraceae)	Feuilles, tiges, écorces	Pobè
14	<i>Ficus mucuso</i> (Moraceae)	Ecorces	Pobè
15	<i>Ficus platyphylla</i>	Tiges, feuilles et	Savè

	Moraceae	écorces	
16	<i>Flacourtia flavescens</i> (Flacourtiaceae)	Feuilles	Abomey-Calavi
17	<i>Grewia barteri</i> (Tiliaceae)	Feuilles, racines	Parakou
18	<i>Hexalobus crispiflorus</i> (Annonaceae)	Ecorces	Pobè
19	<i>Ipomoea batatas</i> (Convolvovulaceae)	Feuilles	Abomey-Calavi
20	<i>Irvingia gabonensis</i> (Simaroubaceae)	Ecorces	Abomey-Calavi
21	<i>Kalanchoe crenata</i> (Crassulaceae)	Feuilles	Abomey-Calavi
22	<i>Kleinedoxa gabonensis</i> (Simaroubaceae)	Ecorces	Kraké
23	<i>Mallotus oppositifolius</i> (Euphorbiaceae)	Feuilles	Pobè
24	<i>Musanga cecropioides</i> (Cecropiaceae)	Ecorces	Pobè
25	<i>Persea americana</i> (Lauraceae)	Feuilles, tiges, graines	Abomey-Calavi
26	<i>Picralima nitida</i> (Apocynaceae)	Ecorces	Pobè
27	<i>Piptadeniastrum africanum</i> (Mimosaceae)	Ecorces	Pobè
28	<i>Psidium guajava</i> (Myrtaceae)	Écorces	Abomey-Calavi
29	<i>Portulaca oleracea</i> (Portulacaceae)	Feuilles	Abomey-Calavi
30	<i>Rytigynia canthioides</i> (Rubiaceae)	Feuilles	Savè
31	<i>Terminalia superba</i> (Combretaceae)	Feuilles, écorces, racines	Abomey-Calavi
32	<i>Trema orientalis</i> (Ulmaceae)	Feuilles	Abomey-Calavi

33	<i>Voacanga Africana</i> (Apocynaceae)	Écorces ou graines	Abomey-Calavi
----	---	-----------------------	---------------

2. Plantes récoltées hors du territoire béninois

N°	Nom et Famille	Organe utilisé	Lieu de récolte
1	<i>Dacryodes edulis</i> (Burceraceae)	Ecorces	Nigéria
2	<i>Enantia chloranta</i> (Annonaceae)	Ecorces	Nigéria
3	<i>Pachypodanthium staudtii</i> (Annonaceae)	Ecorces	Nigéria
4	<i>Baillonella toxisperma</i> (Sapotaceae)	Écorces	Cameroun
5	<i>Tylophora africana</i> (Asclepiadaceae)	Tiges, feuilles	Cameroun

ANNEXE 3 : NOMS VERNACULAIRES DE QUELQUES ESPÈCES VÉGÉTALES À ACTION ANTIBACTÉRIENNE SUR LA SOUCHE PRODUCTRICE DE BLSE

Nom latin	Nom en langue vernaculaire		
	Fon	Yorouba	Dindi
<i>Boswellia dalzielii</i>	-	-	-
<i>Canarium Schweinfurthii</i>	-	Anikantuhu Origbo	-
<i>Flacourtia flavescens</i>	Gbohounkadjè	Kakandika oshere	Kokosiko
<i>Psidium guajava</i>	Kenkun	Arasa	Gbafu
<i>Terminalia superba</i>	Azinii	Afara	-
<i>Voacanga africana</i>	Agbossou ningla	Ako dodo, sherekpen	Teibunmu

Sources : Akoegninou *et al*, 2006; Neuwinger, 2000;

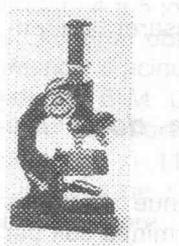
PUBLICATIONS

Ces travaux de recherche ont fait l'objet de trois publications dont les références figurent ci-dessous :

1. ANAGO Eugénie, GBENOU Joachim, BANKOLE Honoré, ADJILE Aurelle, KOUSSEMOU Hugues, BIO NIGAN Safiath, YAROU MAYE Alexis, LOKO Frédéric, MOUDCHIROU Mansourou, Activités antibactériennes de quelques plantes de la pharmacopée africaine sur des souches de *Escherichia coli* productrices de β lactamases. Journal de la Société de Biologie Clinique; (2006) : 51-55.

2. ANAGO Eugénie, LOKO Frédéric, GBENOU Joachim, GBAGUIDI Achille, KOUSSENOUDO Philomène, MOUDACHIROU Mansourou. Inhibition d'une bêta-lactamase à spectre élargi extraite de *Escherichia coli* par les extraits totaux d'organes de 15 espèces végétales de la pharmacopée africaine. Journal de la Société de Biologie Clinique; (2006) : 62-66.

3. AHOYO A.T., L. BABA-MOUSSA, A.E. ANAGO, P. AVOGBE, T. D. MISSIHOUN, F. LOKO, G. PRÉVOST, A. SANNI, K. DRAMANE, Incidence d'infections liées à *Escherichia coli* producteur de bêta-lactamase à spectre élargi au Centre hospitalier départemental du Zou et Collines au Bénin. Médecine et maladies infectieuses. (2007); 37 :746-752.



**ACTIVITÉS ANTIBACTÉRIENNES DE QUELQUES PLANTES DE
LA PHARMACOPÉE AFRICAINE SUR DES SOUCHES DE *Esche-
richia coli* PRODUCTRICES DE β LACTAMASES**

**ANAGO^a Eugénie, GBENOU^b Joachim, BANKOLE^c Honoré, ADJILE^a Aurelle,
KOUSSEMOU^a Hugues, BIO NIGAN^a Safiath, YAROU MAYE^a Alexis, LOKO^a
Frédéric *, MOUDACHIROU^b Mansourou**

a = Laboratoire de Biochimie. Ecole Polytechnique d'Abomey-Calavi. Université d'Abomey-Calavi (UAC). B.P. 2009 Cotonou, BÉNIN.

b = Laboratoire de Pharmacognosie et des Huiles Essentielles. Faculté des Sciences et Techniques/ Faculté des Sciences de la Santé. Université d'Abomey-Calavi (UAC). BÉNIN.

c = Laboratoire de Microbiologie. Ecole Polytechnique d'Abomey-Calavi. Université d'Abomey-Calavi (UAC). B.P. 2009. Cotonou BÉNIN.

* Correspondance : Professeur LOKO Frédéric. Laboratoire de Biochimie. Ecole Polytechnique d'Abomey-Calavi. Université d'Abomey-Calavi. B.P. 2009 Cotonou. BÉNIN.

E-mail : lokofrederic@hotmail.com

RÉSUMÉ

38 extraits totaux éthanoliques de divers organes d'espèces végétales de la pharmacopée africaine ont été testés en vue de dépister des activités antibactériennes éventuelles sur des souches de *Escherichia coli* productrices de β lactamases. 5 extraits inhibent à 100% la croissance d'une souche de *E. coli* productrice de β lactamase à spectre élargi (BLSE).

Boswellia dalzielii et *Flacourcia flavescens* Willd ont été sélectionnés parmi ces cinq espèces végétales pour déterminer leur action inhibitrice sur 35 souches de *E. coli* productrices de BLSE. *Boswellia dalzielii* présente le taux d'inhibition le plus élevé (94% des souches de *E. coli* productrices de BLSE sont inhibées à 100%).

Les CMI et CMB de l'extrait total de *Boswellia dalzielii* ont été déterminées sur 10 souches de *E. coli* productrices de BLSE. Les rapports CMB/CMI correspondants se situent entre 1,0 et 1,70. Les écorces de *Boswellia dalzielii* pourraient donc receler des principes actifs à action bactéricide sur les souches de *E. coli* productrices de BLSE.

Mots-clés : Plantes médicinales, activité antibactérienne, *Escherichia coli*, résistance bactérienne, β lactamases, *Boswellia dalzielii*.

Antibacterial activity of a few traditional medicinal plants against beta-lactamase-producing *Escherichia coli*.

SUMMARY

To aim to detect their antimicrobial activity, 38 ethanolic plants extracts have been tested on β lactamases-producing *Escherichia coli* (*E. coli*) strains. An extended-spectrum-beta-lactamase (ESBL) producing *E. coli* strain was sensitive to 5 plants. Among these, 2 plants extracts were selected in aim to determine the susceptibility of 35 ESBL producing *E. coli* strains. *Boswellia dalzielii* exhibited the highest antimicrobial activity (94% of the tested strains were 100% inhibited).

The MICs and MBCs of *Boswellia dalzielii* were determined using 10 *E. coli* strains which are ESBL producers.

The average values MBC/MIC are between 1.0 and 1.70. The barks of *Boswellia dalzielii* might contain compounds with antibacterial activity.

Keywords: traditional medicinal plants, antibacterial activity, *Escherichia coli*, bacterial resistance, beta-lactamases, *Boswellia dalzielii*.

INTRODUCTION

Depuis l'introduction des antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire, le problème de l'augmentation régulière de la résistance des bactéries se pose de façon constante [1].

Parmi les mécanismes mis en jeu par les bactéries pour résister aux antibiotiques la production d'enzymes inactivatrices occupe une place prépondérante notamment chez les bacilles à Gram négatif (BGN)[2].

Parmi ces enzymes inactivatrices, les β lactamases qui entraînent la perte de l'activité anti-

bactérienne de la β lactamine occupent une place remarquable. L'émergence des souches d'entérobactéries productrices de BLSE constitue un problème préoccupant, puisque ces germes sont responsables d'infections nosocomiales de plus en plus fréquentes dans certains services hospitaliers [3,4].

Les β lactamines occupent une place importante parmi les différentes familles d'antibiotiques utilisées en infectiologie eu égard à leur toxicité relativement faible, notamment vis-à-vis des femmes enceintes et des enfants.

Cette diminution de la stabilité des β lactamines en présence des β lactamases limite donc leur efficacité dans le traitement des maladies infectieuses.

Les échecs thérapeutiques dus à l'émergence des germes multirésistants imposent le recours à de nouvelles sources moins onéreuses et plus accessibles à nos populations, pour le traitement des maladies infectieuses : les plantes utilisées en médecine traditionnelle pourraient répondre à ces exigences.

La production de β lactamases est le mécanisme de résistance le plus fréquent chez les BGN en général et *E. coli* en particulier [5]. Trois groupes de β lactamases sont connues : les pénicillinases qui hydrolysent les pénicillines, les céphalosporinases qui hydrolysent les céphalosporines et les BLSE qui hydrolysent les pénicillines et les céphalosporines. Les BLSE sont apparues à la suite de mutations de pénicillinases bien connues : SHV1, TEM1, etc. La première souche a été décrite à Francfort en 1983 et en France en 1985 [6,7]. Depuis lors, la résistance s'est répandue aux autres β lactamines et particulièrement de nos jours, aux céphalosporines de 3^{ème} génération (Céfotaxime, Ceftriaxime, Ceftriaxone) et aux

monobactames (Aztréonam). Les BLSE peuvent être inhibées par des inhibiteurs de β lactamases tel que l'acide clavulanique. Elles se rencontrent fréquemment chez *E. coli*, mais aussi chez d'autres BGN [8,9].

Les plantes étudiées sont couramment utilisées dans la pharmacopée africaine, dans le traitement des maladies infectieuses ou parasitaires (infections digestives, urinaires, génitales, oropharyngées, ulcérations de la peau, états fébriles etc ...) [10]

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel

35 souches de *E. coli* productrices de BLSE sont isolées d'infections du tractus urinaire. 39 espèces végétales de la pharmacopée africaine couramment utilisées dans le traitement de diverses maladies infectieuses sont récoltées. Les essais bactériologiques sont réalisés sur des organes (feuilles, fleurs, graines, écorces, racines, tiges etc .) de ces espèces végétales. Ces espèces ont été identifiées et authentifiées par le Laboratoire d'Ecologie Appliquée de la Faculté des Sciences Agronomiques de l'Université d'Abomey-Calavi, Bénin.

Méthodes

Préparation des extraits totaux éthanoliques

Les organes séchés sont réduits en poudre. A 20g de poudre on ajoute 100ml d'éthanol à 96°. Le mélange est soumis à une agitation continue pendant 72h puis filtré. Le filtrat est évaporé dans un évaporateur rotatif de type BÜCHI ROTAVAPORT R200. Le concentré est séché à l'étuve à 50°C pendant 72 heures. L'extrait éthanolique obtenu servira pour les essais bactériologiques.

Etudes bactériologiques

Les souches de *E. coli* ont été identifiées avec la galerie API 20E. La détection de β lactamases produites par *E. coli* a été faite en s'inspirant du test acidimétrique en tubes en milieu liquide de Syre [11].

Des solutions de pénicillines et de céphalosporines (Amoxicilline, Amoxicilline+acide clavulanique, Aztréonam, Ceftriaxone, Céfazoline) ont été utilisées en présence de rouge de phénol. La souche de référence de *E. coli* ATCC 25922 a servi comme témoin.

Des solutions (à 200 mg/ml dans l'eau distillée) de 39 extraits totaux de plantes sont stérilisées par filtration sur membrane (pores de 0,2 μ m de diamètre) et testées sur des souches productrices de β lactamases.

Les pourcentages d'inhibition sont déterminés :

$$\text{Pourcentage d'inhibition} = \frac{\text{Nombre de colonies (après action de l'E.T. sur la S.B.)}}{\text{Nombre de colonies (dans la S.B.)}} \times 100\%$$

E.T. = extrait total

S.B. = suspension bactérienne

Un extrait est retenu parmi les extraits ayant induit une inhibition à 100% d'une souche de *E. coli* productrice de BLSE. Il a servi pour la détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et la Concentration Minimale Bactéricide (CMB) sur 10 souches de *E. coli* productrices de BLSE.

La CMI est la concentration pour laquelle il n'y a pas de croissance visible de germes [12,13]. La CMB est la plus faible concentration pour laquelle il y a 0,1% de bactéries survivantes [12,13].

La CMI et la CMB de *Boswellia dalzielii* ont été déterminées sur 10 souches de *E. coli* productrices de BLSE suivant le protocole décrit par Courvallin *et coll.* [13].

Études phytochimiques

Des études phytochimiques qualitatives sont réalisées avec la poudre obtenue par broyage des organes séchés. Il s'agit de la mise en évidence des alcaloïdes, des composés polyphénoliques, des dérivés quinoniques, des saponosides, des triterpénoïdes et stéroïdes, des dérivés cyanogénétiques selon le protocole décrit par Houghton *et coll.* [14].

Études statistiques

La variable centrée réduite "Z" mesure la signification de la différence entre la moyenne des CMI et la moyenne des CMB obtenues pour l'activité antibactérienne de l'extrait total de plantes sur des souches de *E. coli* productrices de BLSE. "Z" est calculée selon la méthode de Murray [15].

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Activités antibactériennes de 10 espèces végétales sur une souche de *E. coli* productrice de BLSE

Sur 38 extraits totaux testés, 10 (26%) inhibent à 100% une souche de *E. coli* productrice de céphalosporinase. Des 10 espèces végétales qui inhibent à 100% la souche de *E. coli* productrice de céphalosporinase, 5 (50%) inhibent à 100% une souche de *E. coli* productrice de BLSE.

Tableau I: Activités antibactériennes de 10 espèces végétales sur une souche de *E. coli* productrice de BLSE.

Espèce végétale	Famille	Organe utilisé	Pourcentage d'inhibition
<i>Boswellia dalzielii</i>	Burseraceae	Ecorces	100%
<i>Carapa procera</i>	Meliaceae	Fruits	60%
<i>Ceiba pentadra</i>	Bombacaceae	Ecorces	40%
<i>Enantia chloranta</i>	Annonaceae	Ecorces	80%
<i>Ficus exasperata</i>	Moraceae	Feuilles, tiges, Ecorces	0%
<i>Flacourcia flavescens willd</i>	Flacourtiaceae	Feuilles	100%
<i>Piptadeniastrum africanum</i>	Mimosaceae	Ecorces	80%
<i>Terminalia superba</i>	Combretaceae	Ecorces	100%
<i>Voacanga africana</i>	Apocynaceae	Ecorces	100%
<i>Voacanga africana</i>	Apocynaceae	Graines	100%

La production d'une BLSE résulte d'une mutation et confère à l'espèce bactérienne en cause une résistance élargie à de nombreux principes actifs antibiotiques [4, 9, 16].

La différence entre le nombre d'espèces végétales inhibant à 100% la souche de *E. coli* productrice de céphalosporinase et la souche de *E. coli* productrice de BLSE suggère que les principes actifs responsables de ces effets exercent probablement une action directe sur une étape essentielle du métabolisme de ces souches. Il s'agirait alors d'une action réellement antibiotique et non d'un effet antiseptique non spécifique tel qu'il est défini dans la littérature [12].

En conséquence l'inhibition incomplète observée pour 45% des souches serait le reflet de l'existence d'un mécanisme de résistance à l'action antibiotique des extraits concernés. Ce mécanisme pourrait être la production de BLSE.

A cette étape nous ne pourrions affirmer avec certitude que certaines espèces végétales à action antibactérienne étudiées recèlent des β lactamines. Cependant, la présence de BLSE est susceptible d'étendre la résistance des germes en cause à des familles d'antibiotiques autres que les β lactamines (les aminosides par exemple) [17]. Ceci vient conforter la thèse de l'existence de principes actifs antibiotiques au sein de ces espèces végétales.

Deux extraits totaux ont été retenus à l'issue d'un choix aléatoire parmi les extraits totaux qui inhibent à 100% la croissance de la souche de *E. coli* productrice de BLSE. Il s'agit de *Flacourcia flavescens willd* et *Boswellia dalzielii*.

Activités antibactériennes des extraits totaux de *Flacourcia flavescens willd* et *Boswellia dalzielii* sur 35 souches de *E. coli* productrices de BLSE

35 souches productrices de BLSE ont été identifiées. Il s'agit de souches productrices de pénicillines et de céphalosporinase simultanément.

Le Tableau II présente les pourcentages d'inhibition de la croissance de 35 souches de *E. coli* productrices de BLSE. Cette action inhibitrice est observée avec les extraits totaux de feuilles de *Flacourcia flavescens willd* et d'écorces de *Boswellia dalzielii*.

Boswellia dalzielii inhibe à 100% la croissance de 33 souches (94%) de *E. coli* productrices de BLSE. Ce pourcentage de souches inhibées est de (85%) pour *Flacourcia flavescens willd*. *Boswellia dalzielii* a donc été retenu pour la détermination de la CMI et la CMB sur 10 souches de *E. coli* productrices de BLSE.

Tableau II : Activités antibactériennes des extraits totaux de *Flacourcia flavescens willd* et *Boswellia dalzielii* sur 35 souches de *E. coli* productrices de BLSE

Pourcentage d'inhibition	<i>Flacourcia Flavescens willd</i>		<i>Boswellia dalzielii</i>	
	Nombre de souches	Pourcentage de souches	Nombre de souches	Pourcentage de souches
100%	30	85%	33	94%
80 – 100%	02	06%	00	00%
60 – 80%	01	03%	01	03%
< 60%	02	06%	01	03%

Détermination des CMI et CMB de l'extrait total de *Boswellia dalzielii* sur 10 souches de *E. coli* productrices de BLSE

Les CMI de l'extrait total d'écorces de *Boswellia dalzielii* sur 10 souches de *E. coli* productrices de BLSE varient entre 60 et 100 mg/mL.

La plupart des CMB s'inscrivent entre 70 et 100 mg/mL. Une seule CMB est de 170 mg/mL.

Les rapports $\frac{CMB}{CMI}$ correspondants se situent entre 1,0 et 1,70.

On note une grande dispersion des valeurs de CMI (CV =41%). Il en est de même pour les CMB (CV = 40%). La détermination de la valeur centrée réduite a permis de noter qu'il n'existe aucune différence significative entre la moyenne des CMI et celle des CMB. ($Z = + 2,22$; $p < 0,05$).

\bar{X} = moyenne ; CV= Coefficient de variation ; S = écart type.

Tableau III : Détermination de la variable centrée réduite "Z" relative aux CMI et CMB de l'extrait total de *Boswellia dalzielii*.

Nombre de souches	\bar{X}_{CMI}	S_{CMI}	CV_{CMI}	\bar{X}_{CMB}	S_{CMB}	CV_{CMB}	Z
10	6,7	2,7	41%	7,5	3	40%	+ 0,22

La grande dispersion observée pour les valeurs de CMI et de CMB pour 10 souches de *E. coli* productrices de BLSE traduit la grande variation des effets antibactériens de *Boswellia dalzielii* sur ces souches. Cette grande variation pourrait être corrélée avec l'hétérogénéité des caractères biochimiques des BLSE secrétées par différentes souches de *E. coli*, hétérogénéité décrite par ROY et coll. [7].

Les rapports CMB/CMI sont inférieurs à 2 ; on pourrait en déduire que l'extrait total de *Boswellia dalzielii* renferme un ou plusieurs principes actifs antibiotiques à effet bactéricide sur les souches de *E. coli* productrices de BLSE étudiées. L'absence de différence significative entre la moyenne des CMI et celle des CMB vient renforcer cette affirmation.

Etudes phytochimiques de *Flacourcia flavescens willd* et *Boswellia dalzielii*

Les études phytochimiques réalisées ont permis de mettre en évidence dans les extraits de feuilles de *Flacourcia flavescens* la présence de tanins galliques, de flavonoïdes et de mucilage. Les anthocyanes, les dérivés quinoniques et les huiles essentielles sont présents à l'état de traces. Les écorces

de *Boswellia dalzielii* recèlent des tanins catéchiques, des anthocyanes, du mucilage et de l'huile essentielle.

Les tanins, les flavonoïdes, les dérivés quinoniques et les huiles essentielles ont des propriétés antibactériennes, antifongiques, anti-infectieuses et antiseptiques [18]. Ces substances contenues dans les extraits de feuilles de *Flacourcia flavescens willd* et dans l'écorce de *Boswellia dalzielii* pourraient avoir des actions antibactériennes synergiques sur les souches de *E. coli* productrices de BLSE.

Remerciements : Nous remercions la CIUF (Coopération Institutionnelle Universitaire Francophone de Belgique).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. BRISSON-NOEL A., TRIEU-CUOT P., SOUGAKOFF W., COURVALLIN P., (1989). Aspects actuels de la résistance bactérienne aux antibiotiques. Ann. Biol. Clin. 47, 98-101.
2. POOLE K., (2004). Resistance to beta-lactam antibiotics. Cell. Mol. Life Sci. 61(17) Sep, 2200-2223. Review.
3. MOITIE D., (1988). Les entérobactéries productrices de β lactamases à spectre élargi ; détection, distribution, épidémiologie et attitudes thérapeutiques. Edition Option Bio, Paris ; 12 – 18
4. HYLE E. P., LIPWORTH A. D., ZAOUTIS T. E., NACHAMKIN I., FISHMAN N. O., BILKER W. B., MAO X., LAUTENBACH E., (2005). Risk factors for increasing multidrug resistance among extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species. Clin Infect. Dis. 40 (9) 1317 – 1324
5. SEFTON A. M., (2000) The impact of resistance on the management of urinary tract infections. Int. J. Antimicrob. Agents. 4, 489 – 491.
6. ROY O., (1988). Les β -Lactamases. Edition Option Bio, Paris.
7. BUVAL J., SOUSSY C., (1990). Antibiothérapie. Edition Masson, Paris.
8. BRADFORD P.A, (2001). Extended-Spectrum β -Lactamases in the 21ST- Century: characterization, epidemiology and detection of the important resistance threat. Clin. Microbiol. Rev. 14, 933-951
9. TANKHIWALE S.S., JALGAONKAR S.V., AHAMAD S., HASSANI U., (2004). Evaluation of extended spectrum beta lactamase in urinary isolates. Indian J Med Res. 120 (6) Dec, 553 –556
10. NEUWINGER H. D., (2000). African Traditional Medicine : A Dictionary of Plant Use and Applications. Editions Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart.
11. SYRE R. B., (1981). Methods for detecting β -Lactamases. Edition D. S. REEVES, Livingstone, 64- 89
12. COURVALLIN P., GOLDJSEIN P., PHILIPPON A., SIROT J., (1985) L'Antibiogramme. Edition MPC-VIDEON, Paris.
13. BERCHE P., GAILLARD J. L., SIMONET M., (1989). Bactéries des infections humaines, Edition Flammarion Médecine-Sciences, Paris .
14. HOUGHTON P. J., RAMAN A., (1998). Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts, Thomson Publishing first edition 154-162.
15. MURRAY R., (1972). Théorie et application de la statistique, Edition M. C. Gray-Hill-Inc. New-York, 73
16. DAOUD Z., HAKIME N., (2003). Prevalence and susceptibility patterns of extended-spectrum beta lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a general university hospital in Beirut, Lebanon. Rev ESP Quimioter, 16 (2), 233 – 238.
17. HANSEN D. S., SIROT D., KOLMOS H. G., (1998). Extended spectrum beta-lactamases in danish *Klebsiella* isolates. Ugeskr Laeger, 15 2261 – 2262.
18. BRUNETON J., (1999). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Editions Tec et Doc Paris ; Editions médicinales internationales, 3^e édition, 1120.



INHIBITION D'UNE BETA LACTAMASE A SPECTRE ELARGI EXTRAITE DE *ESCHERICHIA COLI* PAR LES EXTRAITS TOTAUX D'ORGANES DE 15 ESPECES VEGETALES DE LA PHARMACOPEE AFRICAINE

ANAGO^a Eugénie, LOKO^a Frédéric, GBENOU^b Joachim, GBAGUIDI^c Achille, KOUSSENOUDO Philomène^c, MOUDACHIROU^b Mansourou

a = Laboratoire de Biochimie. Ecole Polytechnique d'Abomey-Calavi. Université d'Abomey-Calavi(UAC). B.P. 2009 Cotonou, BENIN.

b= Laboratoire de Pharmacognosie et des Huiles Essentielles. Faculté des Sciences et Techniques/Faculté des Sciences de la Santé. Université d'Abomey-Calavi(UAC). B.P. 2009 Cotonou, BENIN.

c = Centre d'Information et de Recherche en Santé de la Reproduction 03 BP 2343 Cotonou-Bénin.

* Correspondance: Professeur LOKO Frédéric. Laboratoire de Biochimie. Ecole Polytechnique d'Abomey-Calavi. Université d'Abomey-Calavi (UAC). B.P. 2009 Cotonou, BENIN.

E-mail : lokofrederic@hotmail.com

RESUME

La bêta-lactamase à spectre élargi (BLSE) a été extraite d'une souche de *Escherichia coli*. Son activité hydrolasique sur les β lactamines a été mise en évidence sur la benzylpénicilline par une méthode spectrophotométrique utilisant un indicateur de pH, le rouge de phénol (phénolsulfonephtaléine) dont le coefficient d'extinction molaire a été déterminé ($\epsilon_m = 5,88.10^3 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$).

La moyenne des pourcentages d'inhibition de la BLSE par 11 extraits d'organes de 10 espèces végétales qui inhibent à 100% (groupe A) la croissance de la souche de *E. coli* productrice de BLSE est significativement plus élevée que la moyenne des pourcentages d'inhibition de la BLSE par 5 extraits d'organes végétaux n'ayant aucune action inhibitrice sur la croissance de la souche de *Escherichia coli* (groupe B) ; ($Z=4,05$; $p < 0,01$). Chez les espèces végétales du groupe A on pourrait évoquer la coexistence d'un antibiotique *stricto sensu* et d'un inhibiteur de la BLSE.

Mots clés : β lactamase à spectre élargi (BLSE), *Escherichia coli*, Antibiotique

ABSTRACT

Extended spectrum β -lactamase (ESBL) has been extracted from an isolate of *Escherichia coli*. A spectrophotometric method has been developed for the determination of ESBL activity on β -lactamins, based on the use of phenol red as pH indicator. The apparent molar absorptivity of the complex was $5,88.10^3 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ at 578 nm.

11 extracts of 10 plants inhibiting the growth of ESBL *E. coli* (group A) and 5 extracts of plants without any effect on the growth of ESBL *E. coli* were identified. The average inhibition of ESBL by group A is significantly higher than the average inhibition by group B ($Z=4,05$; $p < 0,01$).

Group A plants seem to contain an antibiotic compound responsible for ESBL *E. coli* growth inhibition and another compound involved in ESBL inhibition.

Keywords: Extended spectrum β -lactamase (ESBL), β -lactamase inhibitors, *Escherichia coli*, Antibiotic.

INTRODUCTION

Escherichia coli (*E. coli*) est responsable de 60 à 80% des infections urinaires notamment des cystites, 20% des septicémies et 40% des méningites néonatales [1].

L'émergence de souches d'entérobactéries productrices de bêta lactamase à spectre élargi (BLSE) constitue un problème préoccupant. En effet, ces germes sont responsables d'infections nosocomiales assez fréquentes dans certains services hospitaliers [2,3,4,5]. Par ailleurs, elles sont isolées de plus en plus chez des patients en consultation externe [6,7]. Les échecs thérapeutiques dus à l'émergence des germes multirésistants imposent le re-

cours à de nouvelles sources moins onéreuses et plus accessibles à nos populations, pour le traitement des maladies infectieuses : les plantes utilisées en médecine traditionnelle pourraient répondre à ces exigences.

C'est dans cette optique que nous avons choisi 15 espèces végétales africaines à activité antimicrobienne identifiées antérieurement dans notre laboratoire pour la détermination de leur action inhibitrice sur la β -lactamase à spectre élargi de *Escherichia coli*.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel

La BLSE est extraite d'une souche de *Escherichia coli* productrice de BLSE. Au cours d'études antérieures dans notre laboratoire, 10 espèces végétales ont inhibé à 100 %, la croissance d'une souche de *Escherichia coli* pro-

ductrice de BLSE (Tableau I). 5 autres espèces végétales n'ont eu aucune action inhibitrice sur la croissance de cette souche de *Escherichia coli* (Tableau II).

Tableau I : 10 espèces végétales (groupe A) inhibant à 100% la croissance de la souche de *E. coli* productrice de BLSE

N°	Espèces végétales	Famille	Organe utilisé
1	<i>Baillonella toxisperma</i>	Sapotaceae	Ecorce
2	<i>Boswellia dalzielii</i>	Burceraceae	Ecorce
3	<i>Carapa procera</i>	Meliaceae	Fruit
4	<i>Ceiba pentadra</i>	Bombacaceae	Ecorce
5	<i>Enantia chloranta</i>	Annonaceae	Ecorce
6	<i>Ficus exasperata</i>	Moraceae	Feuille
7	<i>Flacourtia flavescens willd</i>	Flacourtiaceae	Feuille
8	<i>Piptadeniastrum africanum</i>	Mimosaceae	Ecorce
9	<i>Terminalia superba</i>	Combretaceae	Ecorce
10	<i>Voacanga africana</i>	Apocynaceae	Ecorce, graine

Tableau II : 5 espèces végétales (groupe B) qui n'inhibent pas la croissance de la souche de *E. coli*

N°	Espèces végétales	Famille	Organe utilisé
1	<i>Trema orientalis</i>	Ulmaceae	Feuille
2	<i>Aloe barteri</i>	Aloeaceae	Feuille
3	<i>Alstonia boonei</i>	Apocynaceae	Ecorce
4	<i>Caloncoba welwitschii</i>	Flacourtiaceae	Ecorce
5	<i>Annona senegalensis</i>	Annonaceae	Feuille

Les extraits totaux éthanoliques de ces 15 plantes de la pharmacopée africaine ont été testés sur la BLSE extraite de *Escherichia coli*. Ces espèces ont été identifiées et authentifiées par le Laboratoire d'Ecologie Appliquée de la Faculté des Sciences Agronomiques de l'Université d'Abomey-Calavi, Bénin.

Méthodes

Extraction de la BLSE et action inhibitrice par les extraits végétaux

Des extraits totaux éthanoliques ont été préparés à partir d'organes séchés, réduits en poudre.

La souche de *Escherichia coli* a été lavée puis mise en suspension dans du tampon de lyse (Tampon phosphate 10 mmol/l EDTA 5 mmol/l Triton X 100 0,6% pH 8,0) et soumise à un traitement de lyse par un sonificateur. L'extrait brut obtenu est concentré sur cellule Amicon[®].

Il servira pour la détermination de l'activité BLSE.

La détermination de l'Activité de BLSE a été faite en s'inspirant du test acidimétrique en tubes en milieu liquide de Syre [8] décrite par Courvallin[9]

Le substrat est la benzylpénicilline (1.000.000 U) dissoute dans une solution de rouge de phénol en tampon phosphate 10 mmol/l pH 7,0.

15 espèces végétales ont été étudiées : 10 espèces végétales (soient 11 extraits totaux) inhibent à 100 % la croissance d'une souche de *E. coli* productrice de BLSE. 5 espèces végé-

tales (soient 5 extraits totaux) n'ont aucune action inhibitrice sur la souche de *E. coli* productrice de BLSE. Une solution aqueuse à 200 mg/mL de chaque extrait est préalablement stérilisée par passage sur membrane de stérilisation (diamètre 0,2 µm).

La stérilité de l'extrait est confirmée par ensemencement et culture sur gélose trypticase soja et bouillon trypticase soja et coloration de Gram.

L'extrait brut de BLSE est incubé en présence de chaque solution aqueuse d'extrait végétal à une concentration de 6,15 mg/ml dans le milieu et le pourcentage d'inhibition de la BLSE par les extraits totaux d'organes est déterminé. La souche de référence *E. coli* ATCC 25922 a été utilisée pour le contrôle de qualité.

Etudes statistiques

Les contrôles de qualité des méthodes sont effectués à l'aide du calcul de la moyenne, de l'écart-type et du coefficient de variation. La variable centrée réduite "Z" mesure la signification de la différence entre les moyennes pour un paramètre évalué au sein de deux populations [10].

RÉSULTATS

Extraction de la BLSE de *E. coli*

Les contrôles de stérilité de l'extrait brut de BLSE avant et après concentration sur cellule Amicon® étaient satisfaisants. Par ailleurs, l'addition de l'azide de sodium pour la conservation de l'extrait n'a eu aucun effet inhibiteur ou activateur sur l'enzyme, de même que

l'éthanol qui a servi de solvant pour le rouge de phénol.

Le passage sur cellule Amicon® a permis de concentrer 10 fois l'activité BLSE. _

Détermination de l'activité enzymatique Détermination d'une valeur moyenne du coefficient d'extinction molaire (ϵ_m)

La droite d'étalonnage du substrat-réactif à 578 nm est obtenue avec des concentrations en rouge de phénol allant de 24,42 à 195,34 µmol/L.

Les pentes des droites d'étalonnage obtenues avec dix (10) séries successives conduisent à la détermination d'une valeur moyenne du coefficient d'extinction molaire (ϵ_m)

$$\epsilon_m = 5,88 \cdot 10^{-3} \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1} = 5,88 \cdot 10^3 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$$

L'écart type σ est égal à : $6,15 \cdot 10^2 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Le coefficient de variation (CV) est égal à 10,46%.

Inhibition de la BLSE par 16 extraits d'organes de 15 espèces végétales de la pharmacopée africaine

Les résultats des tests d'inhibition de la BLSE par les 11 extraits d'organes de 10 plantes ayant inhibé à 100 % la croissance d'une souche de *E. coli* productrice de BLSE et les 5 extraits d'organes de plantes n'ayant aucune action inhibitrice sur cette souche sont indiqués dans le Tableau III et le Tableau IV respectivement.

Tableau III : Inhibition de la BLSE par 11 extraits d'organes de 10 plantes (groupe A) inhibant à 100% la croissance d'une souche de *E. coli* productrice de BLSE

N°	Espèces végétales	Famille	Organe utilisé	Pourcentage d'inhibition (%)
1	<i>Baillonella toxisperma</i>	Sapotaceae	Ecorce	85
2	<i>Boswellia dalzielii</i>	Burseraceae	Ecorce	78
3	<i>Carapa procera</i>	Meliaceae	Fruit	62
4	<i>Ceiba pentadra</i>	Bombacaceae	Ecorce	70
5	<i>Enantia chloranta</i>	Annonaceae	Ecorce	75
6	<i>Ficus exasperata</i>	Moraceae	Feuille	91
7	<i>Flacourtia flavescens willd</i>	Flacourtiaceae	Feuille	82
8	<i>Piptadeniastrum africanum</i>	Mimosaceae	Ecorce	67
9	<i>Terminalia superba</i>	Combretaceae	Ecorce	90
10	<i>Voacanga africana</i>	Apocynaceae	Ecorce	74
11	<i>Voacanga africana</i>	Apocynaceae	Graine	82

Tableau IV : Inhibition de la BLSE par 5 espèces végétales (groupe B) qui n'inhibent pas la croissance de la souche de *E. coli*

N°	Espèces végétales	Famille	Organe utilisé	Pourcentage d'inhibition (%)
1	<i>Trema orientalis</i>	Ulmaceae	Feuille	64
2	<i>Aloe barteri</i>	Aloeaceae	Feuille	66
3	<i>Alstonia boonei</i>	Apocynaceae	Ecorce	73
4	<i>Caloncoba welwitschii</i>	Flacourtiaceae	Ecorce	67
5	<i>Annona senegalensis</i>	Annonaceae	Feuille	61

DISCUSSION

Le coefficient d'extinction molaire obtenu au cours des différentes séries de déterminations présente un CV de 10,46 % qui traduit une dispersion relativement acceptable puisqu'elle est proche de 10 % [11]. Néanmoins dans un souci d'exactitude, nous nous sommes imposés de réaliser une droite d'étalonnage pour chaque série de dosages.

A la concentration de 6,15 mg/mL, les 11 extraits totaux d'organes de 10 espèces végétales qui inhibent à 100 % la croissance de la souche de *E. coli* productrice de BLSE exercent également une action inhibitrice importante sur la BLSE extraite de *E. coli*. Cette action correspond à des pourcentages d'inhibition allant de 62 % à 91 % (Tableau III).

5 espèces végétales sans action inhibitrice sur la croissance de la souche de *E. coli* exercent néanmoins une action inhibitrice non négligeable sur la BLSE extraite de *E. coli*. Cette action correspond à des pourcentages d'inhibition allant de 61 % à 73 % (Tableau IV).

La moyenne du pourcentage d'inhibition exercée par les espèces végétales du groupe A est significativement plus élevée que la moyenne du pourcentage d'inhibition exercée par les espèces végétales du groupe B ($Z = 4,05$; $p < 0,01$).

Les 10 espèces végétales dont les extraits totaux inhibent à 100 % la croissance de la souche de *E. coli* productrice de BLSE semblent receler d'une part un principe actif qui inhibe un processus métabolique impliqué dans la croissance de la bactérie et d'autre part un principe actif inhibiteur de la BLSE sécrétée par *E. coli*.

A la différence, les 5 espèces végétales dont les extraits totaux n'ont aucune action sur la croissance de la souche de *E. coli* n'expriment qu'une activité inhibitrice de la BLSE plus atténuée.

Chez les espèces végétales du groupe A, on pourrait évoquer la coexistence synergique d'un antibiotique *stricto sensu* et d'un inhibiteur, avec une potentialisation réciproque des effets de ces deux principes actifs. Ce type de synergie est retrouvé dans quelques associations médicamenteuses (Amoxicilline + acide clavulanique et Pipéracilline + tazobactam etc.) utilisées avec succès dans le traitement des infections à germes multirésistants aux antibiotiques [12]. Cette potentialisation des effets pourrait expliquer cette action inhibitrice sur la BLSE significativement plus élevée dans le groupe A que dans le groupe B ($Z = 4,05$ $p < 0,01$).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] BERCHE P., GAILLARD J. L., SIMMONET M. Bactéries des infections humaines. Edition Flammarion Médecine-Sciences ; Paris ; (1989)
- [2] MOITTE D. Les entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre élargi ; détection, distribution, épidémiologie et attitudes thérapeutiques. Edition Option Bio; Paris ; (1988) ;12-18
- [3] HYLE E.P., LIPWORTH A. D., ZAOUTIS T.E., MACHAMKIN I., FISHMAN N.O., BILKER WB., MAO X., LAUTENBACH E. Risk factors for increasing multidrug resistance among extended-spectrum betalactamase. *Clin infect. Dis.* (2005) may 1, 40 (9):1317-24.
- [4] BRADFORD P. A. Extended-spectrum β -lactamases in the 21ST-Century: Characterization epidemiology and detection of the important resistance threat. *Clin. Microbiol. Rev.*; (2001); 14; 933-951
- [5] PITOUT J.D.D., GREGSON D. B., CHURCH D. L., ELSAYED S., LAUPLAND K.B. Community-Wide Outbreaks of Clonally Related CTX-M-14 β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Strains in the Calgary Health Region . *J Clin Microbiol.* 2005 June; 43(6): 2844–2849.

- [6] **DAZA R., GUTIERREZ J., PIEDROLA J.** Antibiotic susceptibility of bacterial strains isolated from patients with community-acquired urinary tract infections. *Int. J; Antimicrob. Agents* (2001) **18**: 211 – 215
- [7] **GOLDSTEIN F. W., and the Multicenter Study Group.** Antibiotic susceptibility of bacterial strains isolated from patients with community-acquired urinary tract infections in France. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* (2000) **19**: 112-117.
- [8] **SYRE R. B.** Methods for detecting β -lactamases. Edition *D.S. REEVES* ; Livingstone ; (1981) : 64-89
- [9] **COURVALLIN P., GOLDJSEIN F., PHILIPPON A., SIROT J.** L'antibiogramme. Edition *MPC-VI-DEON* ; Paris ; (1985)
- [10] **MURRAY R.** Théorie et application de la statistique. Edition *MC. Gray-Hill-Inc* ; New York ; (1972)
- [11] **BERNARD S.** Biochimie clinique. Edition *Maloine* ; Paris ; (1985)
- [12] **CARBONNELLE B., DENIS F., MARMONIER A., PINON G., VARGUES R.** Bactériologie Médicale ; techniques usuelles. Edition *SIMEP* ; Paris ; (1987).

Article original

Incidence d'infections liées à *Escherichia coli* producteur de bêta lactamase à spectre élargi au Centre hospitalier départemental du Zou et Collines au Bénin

Incidence of infections dues to *Escherichia coli* strains producing extended spectrum betalactamase, in the Zou/Collines Hospital Centre (CHDZ/C) in Benin

A.T. Ahoyo^a, L. Baba-Moussa^{a,*}, A.E. Anago^b, P. Avogbe^a, T.D. Missihoun^a, F. Loko^b,
G. Prévost^c, A. Sanni^a, K. Dramane^a

^aLaboratoire de biochimie et biologie moléculaire, faculté des sciences et techniques, université d'Abomey-Calavi, 04BP0320 Cotonou, Bénin

^bLaboratoire de biochimie, école polytechnique d'Abomey-Calavi (EPAC/UAC), BP 2009, Cotonou, Bénin

^cUPRES EA-3432, institut de bactériologie, faculté de médecine, université Louis-Pasteur, hôpitaux universitaires de Strasbourg, 3, rue Koeberlé, 67000 Strasbourg, France

Reçu le 17 novembre 2006 ; accepté le 6 mars 2007

Disponible sur internet le 16 avril 2007

Résumé

Objectif. – Déterminer l'incidence des souches de *Escherichia coli* (*EC*) productrices de bêta lactamase à spectre élargi (BLSE) dans les services du Centre hospitalier départemental du Zou/Collines (CHDZ/C).

Matériel et méthodes. – L'étude a été réalisée pendant six mois. Les prélèvements ont été collectés auprès des patients hospitalisés depuis plus de 48 heures et dans l'environnement de l'hôpital. Les souches d'*EC* ont été identifiées suivant les critères bactériologiques classiques. Un antibiogramme a été réalisé sur les souches isolées par la méthode de diffusion des disques. La production de BLSE chez les souches a été détectée par la technique du double halo d'inhibition et confirmée pour la présence des gènes *blaTEM* et *blaSHV* par l'amplification génique.

Résultats. – Cent quatre-vingt-dix-sept souches d'entérobactéries ont été isolées chez 342 patients dont 143 *EC*. Parmi elles, 32, soit 22 % étaient des *EC*BLSE. Quatre-vingt-dix-neuf souches d'entérobactéries ont été également isolées de l'environnement de l'hôpital dont 46 *EC*, dont sept (15 %) *EC*BLSE. Les gènes *blaTEM* et *blaSHV* ont été identifiés chez les souches provenant des patients et chez celles provenant de l'environnement. Excepté pour l'imipénème, les souches productrices de BLSE isolées présentaient une plus grande résistance aux autres antibiotiques, notamment les C3G, que celles non productrices ($p < 0,00001$).

Conclusion. – Cette étude a révélé la présence des gènes codant pour les BLSE au sein des souches d'*EC* isolées au CHDZ/C. Elle prouve le besoin de promouvoir un programme de prévention des infections avec une régulation de l'antibiothérapie dans les hôpitaux du Bénin.

© 2007 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Abstract

Objectives. – Over a 6-month period, extended-spectrum betalactamase (ESBL)-producing isolates of *Escherichia coli* (*EC*) were collected from in-patients and their environment at the Zou-Collines Hospital Centre (CHDZ/C) in Benin. The aim of this study was to determine the incidence of ESBL and to describe their phenotypic susceptibility to antibiotics in a secondary hospital (500 beds) in Benin.

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : laminesaid@yahoo.fr (L. Baba-Moussa).

Methods. – From 15 May to 15 November 2005, clinical informations and samples were collected from patients suspected to have nosocomial infections. The isolates were identified, tested for antimicrobial susceptibility and analysed for the presence of ESBL genes *blaTEM* and *blaSHV* by PCR.

Results. – One hundred ninety-seven enterobacteria were isolated from the clinical samples of 342 patients, these isolates included 143 *EC* and 32/143 (22%) of these isolates produced ESBL. Forty-six *EC* were isolated from the environment and 7 (15%) of them produced ESBL. Except for Imipenem for which the difference was not significant, the isolates producing ESBL were more resistant to the other antibiotics (especially to third generation cephalosporins: Ceftriaxone, Cefotaxime, Ceftazidime ($P < 0.00001$)) than non-ESBL producing isolates. Both ESBL genes *blaSHV* and *blaTEM* were identified in the *EC* ESBL strains from patient and from the environment.

Conclusion. – This study shows the presence of ESBL genes among *EC* in various wards of the CHDZ/C hospital proving that there is a need to implement a strict hospital infection control program and a regular surveillance of resistance to antimicrobial agents.

© 2007 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Bêtalactamase à spectre élargi ; *Escherichia coli*

Keywords: Extended-spectrum betalactamase; *Escherichia coli*

1. Introduction

Escherichia coli (*EC*) est une entérobactérie retrouvée en abondance dans la flore commensale humaine, en particulier dans le tube digestif de l'homme qu'elle colonise dès les premières heures de la naissance. Elle constitue l'espèce dominante de la flore aérobie anaérotolérante [1]. L'emploi intensif des antimicrobiens a entraîné la sélection de souches multirésistantes particulièrement celles qui résistent aux bêtalactamines et qui sont isolées des infections urinaires et pulmonaires, des pus, des septicémies, avec une fréquence croissante en milieu hospitalier [2]. Avec l'apparition des bêtalactamases à spectre élargi (BLSE) dans les années 1980 et leur large diffusion de par le monde [3,4], les souches d'*EC* qui la produisent (*ECBLSE*) sont devenues particulièrement importantes en raison de la haute probabilité d'échec lors de l'utilisation empirique d'antibiotiques en l'absence d'antibiogramme. Les infections causées par les souches productrices de BLSE sont associées à une morbidité et une mortalité élevées, à une prolongation de la durée de l'hospitalisation et à une augmentation des coûts d'hospitalisation [5,6]. Aujourd'hui, de nombreuses épidémies hospitalières dues à des entérobactéries productrices de BLSE appartenant souvent, mais non exclusivement à l'espèce *EC* ont été rapportées [7,8]. Les surfaces ainsi que les objets se trouvant dans l'environnement immédiat du patient ont été montrés comme pouvant être contaminés par des bactéries productrices de BLSE [9].

En mars 2005, le programme de contrôle des infections nosocomiales du Centre hospitalier départemental du Zou et Collines (CHDZ/C) a identifié une série d'infections interreliées et causées par *EC* multirésistant aux antibiotiques. La résistance élargie aux céphalosporines de troisième génération dans la famille des entérobactéries a communément été associée à l'expression des BLSE codées par les gènes *blaTEM* et *blaSHV*[10,11] qui ont diffusé à travers les établissements de soins de tous les continents [12]. Des études menées dans certains pays africains confirment la présence des clones de ces BLSE. [13,14].

Le but du présent travail est de déterminer le nombre et l'incidence des souches d'*EC* productrices de BLSE et portant les gènes *blaTEM* et *blaSHV* chez les patients hospitalisés et dans leur environnement au CHDZ/C.

2. Patients et méthodes

2.1. Enquête clinique

Le Centre hospitalier départemental du Zou et des Collines (CHDZ/C) est un hôpital de niveau intermédiaire dans le système sanitaire du Bénin ; il a une capacité d'accueil d'environ 500 lits et reçoit annuellement près de 20 000 patients hospitalisés. Durant une période de six mois allant du 15 mai au 15 novembre 2005, nous avons recueilli de manière prospective des informations cliniques et collecté des prélèvements à visée diagnostique chez les patients hospitalisés. Les patients du service de pédiatrie (150 lits) et ceux de l'hospitalisation ambulatoire ont été exclus de cette étude.

Était inclus dans l'étude, tout patient hospitalisé pendant au moins 48 heures, dans un service participant à l'enquête et chez lequel une souche de *ECBLSE* a été isolée à partir d'un prélèvement à visée diagnostique. Les prélèvements de dépistage ont été exclus. Les dates d'hospitalisation et des prélèvements constituaient les marqueurs d'inclusion dans l'étude. Les dénominateurs suivants ont été collectés sur la base des données administratives : le nombre d'admissions à l'hôpital, le nombre total de journées d'hospitalisation.

Des prélèvements relevant de l'environnement (les surfaces du bloc opératoire, blouses et mains du personnel soignant, dossier du malade, draps, clenche de porte, table d'examen, stéthoscope, brosse de lavage des mains, chariot de soin, monitor d'électrocardiogramme, sanitaire, interrupteur) ont été effectués chaque mois pour la recherche de *ECBLSE*.

2.1.1. Analyses microbiologiques

Tous les prélèvements, quelles que soient leurs origines, ont été traités dans un but diagnostique. *EC* a été isolé des différents prélèvements sur le milieu Rapid *E. coli* AgarTM (Biorad Marnes la coquette France). La confirmation des souches isolées a été réalisée par la galerie biochimique classique.

Les prélèvements environnementaux ont été faits au moyen d'un écouvillon stérile humidifié avec de l'eau physiologique stérile. Après écouvillonnage, le milieu est immédiatement plongé dans un tube contenant le bouillon nutritif TSB (trypticase soya broth Bio Mérieux) et déposés à l'étuve à 37 °C. Le

milieu Lethen broth (Difco) a remplacé le bouillon TSB pour les surfaces désinfectées avant le prélèvement. Lorsqu'une croissance est notée le milieu Rapid TM E coli Agar a été ensemencé pour l'isolement d'*EC*.

2.1.2. Sensibilité des souches aux antibiotiques

Un antibiogramme a été réalisé pour chaque souche isolée par la méthode de diffusion à partir de disques chargés sur gélose de Muller Hinton (Diagnostics Pasteur, Marnes la Coquette, France) selon les recommandations du NCCLS [15]. Les antibiotiques testés sont : amoxicilline, amoxicilline-clavulanate (20/10 µg), pipéracilline (30 µg), céfazoline (30 µg), céfoxitine (30 µg), céfotaxime (30 µg), ceftazidime (30 µg), ceftriaxone (30 µg) aztréonam (30 µg), imipénème (10 µg), gentamicine (10 µg), ciprofloxacine (5 µg), triméthoprime-sulfaméthoxazole (1,25/23,75 µg), et acide nalidixique. La souche d'*EC* ATCC 25922 a servi de souche témoin pour le contrôle de qualité.

2.1.3. Détection de la bêta-lactamase à spectre élargi

Toutes les souches ont été testées pour la production de la bêta-lactamase à spectre élargi en utilisant la méthode du double halo précédemment décrite par Jarlier et al. [16] et Thomson et al. [17]. Le résultat d'un test positif se traduit par une potentialisation de la zone d'inhibition autour des disques de céfotaxime, ceftriaxone, ceftazidime, ou aztréonam en présence de l'acide clavulanique.

2.1.4. Recherche des gènes blaTEM et blaSHV par la PCR

Les souches d'*EC* identifiées comme productrices de BLSE par la méthode du double disque ont été examinées par la PCR classique pour la présence des gènes *blaTEM* et *blaSHV*. L'ADN a été extrait des souches d'*EC* à partir d'une culture fraîche en bouillon nutritif par la technique classique du TEK-phénol chloroforme alcool isoamylique, précipité avec de l'isopropanol lavé avec de l'éthanol à 70 %, et suspendu dans du tampon Tris-EDTA [18]. Les séquences des amorces utilisées pour l'amplification sont les suivantes : pour le gène *blaTEM* : A (5'-GTATCCGCTCATGAGACAATA-3'), et reverse, B(5'-TCT AAA GTA TAT ATG AGT AAA CTT GGT CTG-3') pour le *blaSHV* SHV-F (5'-CGC CGG GTT ATT CTT ATT TGT CGC-3') et SHV-R (5'-TCT TTC CGA TGC CGC CGC CAG TCA-3'), générant un fragment de 947 paires de bases pour le gène *blaTEM* et 1017 paires de bases pour le gène *blaSHV*[19]. L'ADN a été amplifié dans un volume final de 50 µl contenant 25 pmoles de chaque amorce, 50 ng d'ADN, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de dNTP, 1 × tampon de réaction PCR et cinq unités de la *Taq* ADN polymérase (DyNAzyme EXT DNA polymerase). Les conditions de PCR consistent en une étape initiale de dénaturation à 95 °C pendant 30 secondes suivie de 30 cycles d'amplification comprenant chacun une étape d'hybridation à 60 °C (TEM) et 68 °C (SHV) pendant 30 secondes, une étape d'élongation à 72 °C pendant une minute, puis une étape d'extension finale à 72 °C pendant trois minutes. Les produits de la PCR ont été séparés par électropho-

rèse dans un gel d'agarose à 1,2 % (poids/volume) contenant du bromure d'éthidium et les bandes ont été révélées sous UV.

2.2. Méthode de comparaison statistique

Les données ont été encodées et analysées avec le Logiciel SPSS version 10.1. Les différentes proportions ont été comparées par le test exact de Fischer au seuil de signification de 0,05.

3. Résultats

3.1. Fréquence

En six mois, sur 923 patients hospitalisés plus de 48 heures, 572 ont eu un prélèvement à visée diagnostique adressé au laboratoire de microbiologie ce qui représente 62 % du total des patients hospitalisés dans les services de chirurgie générale, de médecine et de gynéco-obstétrique qui ont participé à cette étude. Parmi les 572 patients prélevés et analysés, 342 patients ont eu une infection bactérienne dont 58 % (197/342) sont liées à une entérobactérie (Tableau 1). Les souches d'*EC* représentent 72 % (143/197) de ces entérobactéries et ont été isolées pour la majorité dans les urines environ 65 % (93/143) (Tableau 2). L'incidence de tous les nouveaux cas de patients porteurs de *ECBLSE* est de 3,5 % et la proportion des souches *ECBLSE* au sein des souches d'*EC* est de 22 % (32/143) (Tableau 1).

En outre, 420 prélèvements environnementaux ont été analysés pour la recherche des souches d'*EC*. Seulement 11 % (46/420) de ces prélèvements sont positifs à *EC* dont 15 % (7/46) sont des *ECBLSE* (Tableau 1). Le Tableau 3 montre la répartition de ces souches en fonction des lieux de prélèvement. On peut remarquer que les sanitaires présentent le taux le plus élevé de contamination à *EC* 47 % (8/17).

3.2. Caractéristiques des patients

L'âge des 32 patients porteurs d'une souche de *ECBLSE* varie de 18 à 75 ans avec une classe modale de (20–49 ans) qui comporte 24 patients soit un pourcentage de 75 %. Dix-huit des patients, soit 56 %, sont de sexe féminin. La majorité des patients (20 sur 32) étaient hospitalisés dans le service de chirurgie. La durée d'hospitalisation varie de 4 à 14 jours pour dix des patients et de plus de 15 pour les autres. Au moment de l'isolement de la première souche de *ECBLSE*, 19 des patients soit 59 % étaient transférés d'un autre centre de santé, pendant que trois patients soit environ 10 % sont arrivés directement de leur domicile et le reste, dix patients sont des accidentés de la voie publique.

Avant leur admission au CHD/ZC tous les patients ont reçu un traitement irrégulier d'antibiotique, soit par automédication 21 (65 %) patients, soit sur prescription médicale 11 (35 %) patients. Au cours de la présente hospitalisation, le premier traitement d'antibiothérapie n'est précédé d'aucun

Tableau 1
Fréquence d'isolement de *Escherichia coli* durant la période d'étude

Table 1
Frequency of identification of *Escherichia coli* during the study period

Type de prélèvement	Fréquence des infections bactériennes nosocomiales (%)	Pourcentage de culture positive aux entérobactéries	Pourcentage de cultures positives à <i>EC</i>	Pourcentage d' <i>EC</i> au sein des entérobactéries isolées	Pourcentage d' <i>EC</i> BLSE dans <i>EC</i>	Incidence des <i>EC</i> BLSE pour 100 admissions
Prélèvements à visée diagnostique (<i>n</i> = 572)	60 (342/572)	57,7 (197/342)	42 (143/342)	72,5 (143/197)	22 (32/143)	3,5 (32/923)
Prélèvements environnementaux (<i>n</i> = 420)	–	23,5 (99/420)	11 (46/420)	46 (46/99)	15 (7/46)	–
Total		39 (296/762)	25 (189/742)	64 (189/296)	21 (39/189)	

Tableau 2
Fréquences d'isolement de *Escherichia coli* par nature de prélèvements

Table 2
Frequency of identification of *Escherichia coli* according to the nature of samples

Nature du prélèvement	Pourcentage d' <i>EC</i>	Pourcentage d' <i>EC</i> BLSE
Urines	65 (93/143)	22,6 (21/93)
Plaies opératoires	22 (31/143)	16 (5/31)
Sang	1,4 (2/143)	50 (1/2)
Secrétions respiratoires	4 (6/143)	33 (2/6)
Secrétions vaginales	7,6 (11/143)	27 (3/11)
Total	143	22 (32/143)

Tableau 3
Distribution des souches d'*EC* isolées dans l'environnement hospitalier en fonction des sites de prélèvements au CHDZ/C

Table 3
Distribution of *EC* strains identified in the hospital environment according to sites of sampling at the CHDZ/C

Lieux de prélèvements	Prélèvements totaux	Prélèvements positifs	
		<i>Escherichia coli</i>	<i>EC</i> BLSE
Mains du personnel	121	2	0
Blouses du personnel	62	4	0
Chariots de soin	52	5	0
Stéthoscopes	4	0	0
Brosses de lavage des mains	45	12	2
Tables d'examen	25	4	1
Sanitaires	17	8	2
Interrupteurs	8	2	1
Dossiers des patients	60	6	1
Clenches de porte	26	3	0
Total	420	46	7

examen de laboratoire et c'est souvent son échec qui conduit le médecin à prescrire des examens microbiologiques.

Les diagnostics d'hospitalisation posés ont été les suivants par ordre de fréquence décroissante: les interventions chirurgicales diverses 38 %, les accidents graves de la voie publique 16 % ; l'hypertension artérielle 14 %, les cardiopathies 12 %, les pathologies hépatiques 10 %, les pneumopathies 10 %.

3.3. Sensibilité aux antibiotiques des souches isolées

Dans l'ensemble, les antibiogrammes montrent une grande hétérogénéité des souches isolées (Tableau 4). La résistance la plus faible a été observée pour l'imipénème aussi bien pour les souches *EC*BLSE (5 %) que pour les souches *EC* non

Tableau 4
Sensibilité des 189 souches de *Escherichia coli* aux antibiotiques par la méthode des disques

Table 4
Susceptibility of the 189 *Escherichia coli* strains to various antibiotics using the diffusion disk test

Antibiotiques	Pourcentage de résistance des souches de <i>EC</i> BLSE (N=39)	Pourcentage de résistance des souches de <i>EC</i> non BLSE (N=150)	<i>p</i> value ^a
Amoxicilline	100 (39/39)	62 (93/150)	< 0,05
Amoxicilline-acide clavulanique	97,5 (38/39)	53 (80/150)	< 0,05
Céfalotine	64 (25/39)	21 (32/150)	< 0,05
Ceftriaxone	97,5 (38/39)	29 (44/150)	< 0,05
Céfotaxime	87 (34/39)	32 (48/150)	< 0,05
Ceftazidime	97,5 (38/39)	34 (51/150)	< 0,05
Aztréonam	80 (31/39)	35 (53/150)	< 0,05
Gentamicine	74 (29/39)	51 (77/150)	< 0,05
Ofloxacin/cipro	48 (19/39)	16 (24/150)	< 0,05
Acide nalidixique	69 (27/39)	26 (39/150)	< 0,05
Doxycycline	82 (32/39)	27 (30/150)	< 0,05
Triméthoprime-sulfaméthoxazole	92 (36/39)	67 (101/150)	< 0,05
Imipénème	5 (2/39)	2 (3/150)	> 0,05
Pipéracilline	98 (38/39)	19 (28/150)	< 0,05

N : nombre de souches.

^a *p* < 0,05 (test de Fisher exact, 2-tailed) indique les différences statistiquement significatives dans les taux de résistance.

BLSE (2 %) (Tableau 4). Cette différence n'est pas significative (*p* = 0,59). Les fréquences de résistance à l'amoxicilline, à la céfalotine, qui sont des antibiotiques utilisés dans le traitement de première intention des infections urinaires sont relativement élevées dans les deux groupes mais elles le sont plus pour les souches de *EC*BLSE que pour les souches *EC* non BLSE (Tableau 4). Cette différence est très significative (*p* < 0,0005). Environ 21 % (39/189) des souches d'*EC* isolées durant la période de l'étude sont productrices de BLSE.

Mis à part l'imipénème, il y a une différence statistiquement significative de résistance entre les souches productrices et non productrices de BLSE pour tous les autres antibiotiques (*p* < 0,001), en particulier pour les céphalosporines de troisième génération (ceftriaxone, céfotaxime, ceftazidime) (Tableau 4).

3.3.1. Amplification génique de blaSHV et blaTEM

Les 39 souches identifiées comme productrices de bêta-lactamase à spectre élargi ont été testées par PCR. Dix-sept sou-

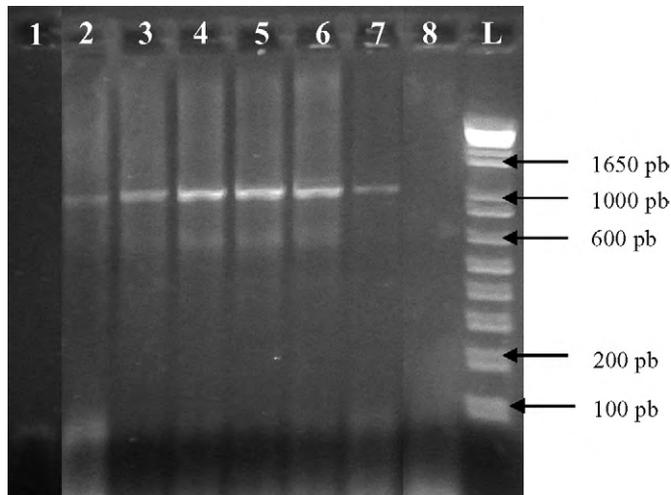


Fig. 1. Souches de ECBLSE avec *blaTEM*.

Fig. 1. ECESBL with *blaTEM*.

Ligne 1 : témoin négatif de la PCR.

Lignes 2–7 : échantillons positifs à la PCR pour *blaTEM*.

Ligne 8 : échantillon négatif à la PCR pour *blaTEM*.

Ligne L : marqueur de poids moléculaire.

ches isolées dans le service de chirurgie dont 12 de patients et 5 de l'environnement sont porteuses du gène *blaSHV* et présentent le même profil de résistance aux antibiotiques. Six autres souches provenant de patients du service de médecine générale et porteuses du gène *blaSHV* sont de même antibiotype mais différent des précédents. Huit souches possèdent le gène *blaTEM* et sont présentes uniquement chez les patients, trois souches possédaient à la fois les gènes *blaSHV* et *blaTEM*. La Fig. 1 montre les résultats de PCR pour quelques échantillons positifs pour *blaTEM*. Trois souches provenant de patients, deux souches de l'environnement, identifiées comme productrices de bêta-lactamase à spectre élargi ne possèdent ni le gène *blaSHV* ni le gène *blaTEM*. Elles possèdent d'autres gènes codant pour des BLSE, probablement *blaCTX* fréquemment rencontré dans les hôpitaux en Afrique [20,21]. Au total, sur les 32 souches de patients, productrices de bêta-lactamase à spectre élargi, 18 possèdent le gène *blaSHV*, huit possèdent le gène *blaTEM*, trois possèdent à la fois les deux gènes et trois autres ne possèdent aucun des deux gènes.

4. Discussion

L'objectif principal de notre travail était d'établir la fréquence des souches d'*EC* productrices de bêta-lactamase à spectre élargi causant des infections chez les patients hospitalisés dans les services du CHD/ZC au Bénin. Notre étude a montré que la proportion des souches ECBLSE au sein de l'espèce *EC* est relativement élevée (22 %) en comparaison à des fréquences de 12 et 14,3 %, respectivement trouvées par Ho et al. [22] à Hong Kong et Gangoué et al. à Yaoundé au Cameroun [14]. Ce résultat paraît être du même ordre de grandeur que les proportions trouvées dans les pays africains à taux élevés de BLSE, comme la Tanzanie 28,7 % rapporté par Bjørn Blomberg et al. [23].

Les circulations inter- et intrahospitalières des patients porteurs d'ECBLSE, ainsi que la fréquence de leurs séjours hospitaliers préalables à l'isolement des ECBLSE, apparaissent importantes et constituent des facteurs qui prédisposent à l'acquisition des bactéries multirésistantes. La grande majorité des souches d'*EC* isolées dans notre étude sont sensibles à l'imipénème, en revanche il est à noter les résistances fréquentes au triméthoprimé-sulfaméthoxazole et à l'amoxicilline qui, du reste, sont des antibiotiques abondamment prescrits de par leurs disponibilités et leurs coûts abordables sur le marché local. La plupart des souches ECBLSE étaient corésistantes à la gentamicine, à la ciprofloxacine et au triméthoprimé-sulfaméthoxazole ; cela corrobore les travaux de Tolun et al. [24] et de Alhambra et al. [25]. Les mécanismes de cette résistance ne sont pas encore clairement établis, mais certains auteurs suggèrent la cotransmission des BLSE et des autres résistances aux antibiotiques par un même plasmide de conjugaison [26].

Les profils de résistance aux antibiotiques et les différents phénotypes de BLSE obtenus ont montré que les souches appartenaient à plusieurs clones. Cela témoigne des modes de transmission variées comme la dissémination clonale de plusieurs souches multirésistantes ou la transmission d'un plasmide entre plusieurs souches avec sélection polyclonale.

Ces souches renferment les gènes *BlaSHV* et ou *BlaTEM* et sont résistantes aux céphalosporines de troisième génération à savoir ceftriaxone, céfotaxime, ceftazidime. Plusieurs travaux avaient montré que la présence de ces gènes pouvait conférer la résistance aux céphalosporines de troisième génération.

Les souches de ECBLSE de phénotype de résistance CAZa (niveau de résistance à la ceftazidime plus important que celui de céfotaxime, ceftriaxone et aztréonam) possédant le gène *blaSHV*, isolées chez 12 des patients présents à la même période dans le service de chirurgie et dans l'environnement du même service, ont des profils de résistance aux antibiotiques superposables, ce qui évoque une probable épidémie intrahospitalière liée à cette bactérie. Enfin la fréquence élevée de ECBLSE que nous avons mise en évidence est le reflet du niveau moyen de l'hygiène dans l'hôpital.

Lucet et al. [7] ont montré qu'il est possible de contrôler efficacement des situations dans lesquelles les BLSE sont épidémiques ou hyperendémiques par l'identification correcte des pathogènes, l'hygiène des mains, l'isolement des patients, le port de gants et de blouses. Cette étude a montré que ces recommandations n'étaient que partiellement appliquées durant la période de l'étude. Le défaut d'information et le manque de sensibilisation des personnels médicaux et paramédicaux aux problèmes des bactéries multirésistantes semblent être les causes probables de la non-observance des mesures d'hygiène.

Dans notre étude, les efforts pour améliorer la désinfection des mains et de l'environnement immédiat du patient n'ont pas suffi pour enrayer immédiatement la transmission qui s'est poursuivie au-delà de deux mois. En effet, le changement de comportement en faveur de l'observance de l'hygiène des mains a pris du temps.

En outre, si le rôle primordial du laboratoire de microbiologie clinique est de fournir un résultat d'identification bactérienne qui permet de poser un diagnostic étiologique et celui de l'antibiogramme qui constitue une aide aux traitements [27], des défaillances sont observées dans bon nombre de pays africains y compris le Bénin. En effet, devant toute suspicion de maladie infectieuse, le clinicien prescrit au malade un traitement antimicrobien avant l'identification précise du micro-organisme en cause; il choisit en général un antibiotique à large spectre dont l'échec conduit à la demande des examens microbiologiques favorisant ainsi la sélection des souches multirésistantes.

L'inadaptation des structures pour l'isolement des malades, l'insuffisance en quantité et en qualité du matériel médical mis à la disposition des soignants et la vente illicite des médicaments contrefaits ont été des facteurs favorisant la dissémination des ECBLSE dans notre contexte.

Plusieurs mesures ont été prises pour circonscrire la dissémination des souches d'EC, notamment, l'éducation du personnel, un meilleur accès au savon pour le lavage des mains avec amélioration de la friction hydroalcoolique entre deux patients, une plus grande propreté de l'établissement, la fermeture pour un mois des salles de bain communes, la surveillance du lavage des mains des patients et de leurs familles avant les repas et les activités.

Le cohortage des patients porteurs de bactéries multirésistantes (BMR) dans deux grandes salles avec possibilité de circuler dans l'établissement a été décisif dans la maîtrise de l'épidémie. L'efficacité des mesures d'isolement pour réduire les infections à BMR en l'absence de politique de restriction de l'utilisation des antibiotiques est bien montrée dans un travail effectué en France, en 2001, par Eveillard [28] et conforte nos résultats.

Une politique d'antibiothérapie justifiée et/ou d'une restriction dans la prescription des céphalosporines de troisième génération et même de toutes les céphalosporines conduisent à une diminution significative de la fréquence des BLSE comme l'ont rapporté Patterson et al. [29]. De telles directives ne sont pas encore en vigueur au Bénin.

5. Conclusion

Cette étude a révélé l'existence réelle des infections provoquées par ECBLSE au CHDZ/C en 2005. L'analyse des souches isolées à partir des 32 patients et de quelques prélèvements de l'environnement montre une prédominance de la présence du gène *blaSHV* et permet de suspecter la dissémination d'une souche épidémique du clone *blaSHV* chez 12 malades hospitalisés dans les services de chirurgie sans toutefois que le mode de diffusion ait pu être élucidé. Une meilleure observance de l'hygiène des mains seule n'a pas permis de limiter la propagation de ce micro-organisme très résistant aux antibiotiques. L'association des compétences des cliniciens, des microbiologistes et des équipes de contrôle de l'infection est nécessaire pour le succès et s'impose comme une nécessité dans notre contexte.

Remerciements

Nous remercions les patients, les soignants et le personnel de laboratoire, qui ont accepté de collaborer à la réalisation de l'enquête. Le Pr Michel Delmée et le Dr Anne Simon du Laboratoire de microbiologie de l'UCL sont remerciés pour leur assistance et Michèle Janssens pour avoir mis à notre disposition les souches témoins. Ce travail a en partie été supporté par la Direction départementale de la santé du Zou et des Collines à Abomey au Bénin.

Références

- [1] Cooke EM. *Escherichia coli* and man. London: Churchill Living Stone; 1973.
- [2] Lucet JC, Chevret S, Decre D, et al. Outbreak of multiresistant enterobacteriaceae in an intensive care unit: epidemiology and risk factors for acquisition. *Clin Infect Dis* 1996;22:430–6.
- [3] Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:933–51.
- [4] Knothe H, Shah P, Krcmery V, Antal M, Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection* 1983;11:315–7.
- [5] Patterson JE. Antibiotic utilization: is there an effect on antimicrobial resistance. *Chest* 2001;119:426–30.
- [6] Masterton R, Drusano G, Paterson DL, Park G. Appropriate antimicrobial treatment in nosocomial infections—the clinical challenges. *J Hosp Infect* 2003;55:1–12.
- [7] Lucet J-C, Decré D, Fichelle A, Joly-Guillou M-L, Pernet M, Deblangy C, et al. Control of a prolonged outbreak of extended-spectrum β -lactamase-producing enterobacteriaceae in a university hospital. *Clin Infect Dis* 1999;20:1411–8.
- [8] Rodríguez-Baño J, Navarro MD, Romero L, Martínez-Martínez L, Muniain MA, Perea EJ, et al. Epidemiology and clinical features of infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in non-hospitalized patients. *J Clin Microbiol* 2004; 42:1089–94.
- [9] Tietz A, Francioli P, Widmer AF, et al. Bêtalactamases à spectre étendu : implications pour l'hygiène hospitalière. *Swiss noso* 2004 (11, Numéro 4, article 2).
- [10] Dubois SK, Marriott MS, Amyes SG. TEM- and SHV-derived extended-spectrum beta-lactamases: relationship between selection, structure and function. *J Antimicrob Chemother* 1995;35:7–22.
- [11] Heritage J, M'Zali FH, Gascoyne-Binzi D, Hawkey PM. Evolution and spread of SHV extended spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother* 1999;44:309–18.
- [12] Stobberingh EE, Arends J, Hoogkamp-Korstanje JAA, Goessens WHF, Visser MR, Buiting AGM, et al. Occurrence of extended-spectrum beta-lactamases in Dutch hospitals. *Infection* 1999;27:348–54.
- [13] Pitout JDD, Thomson KS, Hanson ND, Ehrhardt AF, Moland ES, Sanders CC. β -Lactamases responsible for resistance to expanded-spectrum cephalosporins in *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis* isolates recovered in South Africa. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:1350–4.
- [14] Gangoué-Piéboji J, Bedenic B, Koulla-Shiro S, Randegger C, Adio D, et al. Extended-spectrum- β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Yaounde, Cameroon. *J Clin Microbiol* 2005;43:3273–7.
- [15] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 12th informational supplement. Wayne, Pa: NCCLS document M100-S12; 2002.
- [16] Jarlier V, Nicolas M, Fournier G, Philippon A. Extended broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis* 1988;10:867–78.

- [17] Thomson KS, Sanders CC. Detection of extended-spectrum β -lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae*: comparison of the double-disk and three-dimensional tests. *Antimicrob Agents Chemother* 1992;36:1877–82.
- [18] Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, et al. *Current protocols in molecular biology*. Chichester, United Kingdom: John Wiley & Sons, Inc.; 1994.
- [19] Tzelepi E, Giakkoupi P, Sofianou D, Loukova V, Kermeroglou A, Tsakris A. Detection of extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes*. *J Clin Microbiol* 2000;38:542–6.
- [20] Kariuki S, Corkill JE, Revathi G, Musoke R, Hart CA. Molecular characterization of a novel plasmid-encoded cefotaximase (CTX-M-12) found in clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates from Kenya. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:2141–3.
- [21] Faustine N, Roland J, Stig H, Willy U, Nina L. Extended spectrum-lactamases among Gram-negative bacteria of nosocomial origin from an Intensive Care Unit of a tertiary health facility in Tanzania. *BMC Infect. Dis.* 2005;5:86 10.1186/1471-2334-5-86.
- [22] Ho PL, Tsang DNC, Que TL, Ho M, Yuen KY. Comparison of screening methods for detection of extended-spectrum β -lactamases and their prevalence among *Escherichia coli* and *Klebsiella* species in Hong Kong. *APMIS* 2000;108:237–40.
- [23] Bjørn B, Roland J, Manji KP, Tamim BS, Mwakagile DSM, et al. High rate of fatal cases of paediatric septicaemia caused by Gram-negative bacteria with extended-spectrum beta-lactamases in Dar es Salaam, Tanzania. *J Clin Microbiol* 2005;43:745–9.
- [24] Tolun V, Kucukbasmaci O, Torumkuney-Akbulut D, Catal C, Ang-Kucuker M, Ang O. Relationship between ciprofloxacin resistance and extended-spectrum beta-lactamase production in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains. *Clin Microbiol Infect* 2004;10:72–5.
- [25] Alhambra A, Cuadros JA, Cacho J, Gomez-Garces JL, Alos JI. In vitro susceptibility of recent antibiotic-resistant urinary pathogens to ertapenem and 12 other antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 2004;53:1090–4.
- [26] Martinez-Martinez L, Pascual A, Jacoby GA. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* 1998;351:797–9.
- [27] Pfaller MA, Herwaldt LA. The clinical microbiology laboratory and infection control: emerging pathogens, antimicrobial resistance, and new technology. *Clin Infect Dis* 1997;25:858–70.
- [28] Eveillard M, Eb F, Tramier B, Schmit JL, Lescure FX, Biendo M, et al. Evaluation of the contribution of isolation precautions in prevention and control of multi-resistant bacteria in a teaching hospital. *J Hosp Infect* 2001;47:116–24.
- [29] Paterson DL, Mulazimoglu L, Casellas JM, Ko WC, Goossens H, Von Gottberg A, et al. Epidemiology of ciprofloxacin resistance and its relationship to extended-spectrum beta-lactamase production in *Klebsiella pneumoniae* isolates causing bacteremia. *Clin Infect Dis* 2000;30:473–8.

RÉSUMÉ

Au cours de cette étude les propriétés antibactériennes d'extraits totaux éthanoliques de 38 plantes médicinales africaines ont été testées sur des souches de *Escherichia coli* (*E. coli*) productrices de bêta-lactamases à spectre élargi (BLSE) et non BLSE. L'analyse par PCR de l'ADN de ces souches isolées d'infections urinaires a révélé la présence de gènes de bêta-lactamases de type TEM.

Onze extraits de plantes ont inhibé totalement la croissance d'une souche non BLSE. Huit extraits de plantes ont exercé une inhibition de 100% sur la croissance d'une souche BLSE. Parmi ces plantes, *Terminalia superba* inhibe à 100% la croissance de 30 souches de *Escherichia coli* productrices de bêta-lactamases. La concentration minimale inhibitrice (CMI) la plus faible (1,25 mg/mL) est obtenue pour les extraits d'écorces de *Terminalia superba*.

Le screening phytochimique par chromatographie sur couche mince a révélé la présence de tanins, de mucilages, de dérivés coumariniques et anthracéniques dans cette plante.

L'inhibition par les extraits de plantes de l'activité hydrolasique des bêta-lactamases sur le substrat benzylpénicilline a été évaluée à 578 nm par une méthode spectrophotométrique. L'extrait éthanolique d'écorces de *Terminalia superba* a inhibé à 98% la non BLSE et à 81% la BLSE extraites de *Escherichia coli*.

Les pHi déterminés par chromatofocalisation sont de 5,4 pour la non BLSE et 6,4 pour la BLSE.

Les résultats obtenus suggèrent la présence dans l'extrait éthanolique d'écorces de *Terminalia superba*, d'inhibiteurs de bêta-lactamases associés à l'action de substances inhibitrices de la croissance des souches de *Escherichia coli*.

Mots clés : *Terminalia superba*, activité antibactérienne, *Escherichia coli*, inhibiteur de bêta-lactamase.

ABSTRACT

During this study, the ethanolic extracts of 38 african ethnomedicinal plants were screened for antibacterial activities against extended spectrum beta-lactamase (ESBL) and non-ESBL producing *Escherichia coli* (*E. coli*) strains. The PCR analysis of the DNA from these *E. coli* strains isolated by urinary tract infections revealed the presence of type TEM beta-lactamases genes.

The growth of a non ESBL *E. coli* strain is totally inhibited by 11 plants extracts. 8 plants extracts showed 100% inhibition of the growth of an ESBL producing *E. coli* strain. Among these botanical species, *Terminalia superba* inhibited totally the growth of 30 beta-lactamases producing *E. coli* strains.

The ethanolic stem barks extract of *Terminalia superba* showed the lowest MIC (Minimum Inhibitory Concentration) (1,25 mg/mL). The phytochemical screening of extracts by TLC (Thin Layer Chromatography) revealed that this plant contained tannins, mucilage, coumarin and anthracen derivatives.

The plants extracts were tested for their ability to inhibit the hydrolysis of benzylpenicillin by beta-lactamases using a spectrophotometric assay at 578 nm. The ethanolic stem barks extract of *Terminalia superba* showed high inhibition of the tested beta-lactamases (98 % for the non ESBL and 81 % for the ESBL). The pHi values determined by chromatofocusing were 5,4 for the non ESBL and 6,4 for the ESBL.

These results suggest that *Terminalia superba* contains inhibitors of beta-lactamases as well as inhibitors of the growth of *E. coli* strains.

Key words: *Terminalia superba*, antibacterial activity, *Escherichia coli*, beta-lactamase inhibitor.