



**ACTIVITES ANTIBACTERIENNES DE QUELQUES PLANTES DE LA PHARMACOPEE AFRICAINE SUR DES SOUCHES DE *Escherichia coli* PRODUCTRICES DE  $\beta$  LACTAMASES**

**ANAGO<sup>a</sup> Eugénie, GBENOU<sup>b</sup> Joachim, BANKOLE<sup>c</sup> Honoré, ADJILE<sup>a</sup> Aurelle, KOUSSEMOU<sup>a</sup> Hugues, BIO NIGAN<sup>a</sup> Safiath, YAROU MAYE<sup>a</sup> Alexis, LOKO<sup>a</sup> Frédéric \*, MOUDACHIROU<sup>b</sup> 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](mailto: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  $\beta$  lactamases. 5 extraits inhibent à 100% la croissance d'une souche de *E. coli* productrice de  $\beta$  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,  $\beta$  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  $\beta$  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  $\beta$  lactamases qui entraînent la perte de l'activité anti-

bactérienne de la  $\beta$  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  $\beta$  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  $\beta$  lactamines en présence des  $\beta$  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  $\beta$  lactamases est le mécanisme de résistance le plus fréquent chez les BGN en général et *E. coli* en particulier [5]. Trois groupes de  $\beta$  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  $\beta$  lactamines et particulièrement de nos jours, aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération (Céfotaxime, Ceftazidime, Ceftriaxone) et aux

monobactames (Aztréonam). Les BLSE peuvent être inhibées par des inhibiteurs de  $\beta$  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  $\beta$  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  $\mu$ m de diamètre) et testées sur des souches productrices de  $\beta$  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  $\beta$  lactamines. Cependant, la présence de BLSE est susceptible d'étendre la résistance des germes en cause à des familles d'antibiotiques autres que les  $\beta$  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  $\beta$  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  $\beta$ -Lactamases. Edition Option Bio, Paris.
7. BUVAL J., SOUSSY C., (1990). Antibiothérapie. Edition Masson, Paris.
8. BRADFORD P.A, (2001). Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in the 21<sup>ST</sup> - 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  $\beta$ -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<sup>e</sup> édition, 1120.