



**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 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.

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* productrice de BLSE (Tableau I). 5 autres es-

pèces 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^R. 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 végétales (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 préalable-

ment 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)

$$\epsilon_m = \frac{5,88}{5,88 \cdot 10^{-3}} \cdot 10^{-3} \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1} = 5,88 \cdot 10^3 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$$

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 secrétée 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] MOITTIE 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-VIDEON* ; Paris ; (1985)
- [10] MURRAY R.** Théorie et application de la statistique. Edition *MC. Gray-Hill-Inc* ; NewYork ; (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).