



REPUBLIQUE DU MALI



MINISTÈRE DES ENSEIGNEMENTS SECONDAIRE, SUPÉRIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ DE BAMAKO

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PHARMACIE ET D'ODONTO-STOMATOLOGIE
(FMPOS)

Année universitaire : 2006-2007

N°

Thème

Action inhibitrice d'extraits de *Terminalia superba* sur des
souches de *Escherichia coli* productrices de β -lactamases; propriétés
biochimiques des β -lactamases

Thèse

Présentée et soutenue publiquement le 28/02/2008

Devant la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie

Par

Mlle Armelle Mylène LOKO née le 16 Avril 1983 à Cotonou

Pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie (DIPLOME D'ÉTAT)

COMPOSITION DU JURY

Président : Pr Bakari CISSE

Membres : Pr Ibrahim I. MAÏGA

Pr Elimane MARIKO

Co-directeur : Pr Frédéric S. LOKO

Directeur de thèse : Pr Drissa DIALLO

LISTE DES ENSEIGNANTS

**FACULTE DE MEDECINE DE PHARMACIE ET D'ODONTO-
STOMATOLOGIE**
Année Universitaire 2007-2008

ADMINISTRATION

DOYEN : ANATOLE TOUNKARA – PROFESSEUR

1^{er} ASSESSEUR : DRISSA DIALLO – MAÎTRE DE CONFERENCES

2^{ème} ASSESSEUR : SEKOU SIDIBE – MAÎTRE DE CONFERENCES

SECRETAIRE PRINCIPAL : YENIMEGUE ALBERT DEMBELE - PROFESSEUR

AGENT COMPTABLE : MADAME COULIBALY FATOUMATA TALL –
CONTROLEUR DES FINANCES

LES PROFESSEURS HONORAIRES

Mr Alou BA	Ophtalmologie
Mr Bocar SALL	Orthopédie Traumatologie-Secourisme
Mr Souleymane SANGARE	Pneumo-phtisiologie
Mr Yaya FOFANA	Hématologie
Mr Mamadou L.TRAORE	Chirurgie Générale
Mr Balla COULIBALY	Pédiatrie
Mr Mamadou DEMBELE	Chirurgie Générale
Mr Mamadou KOUMARE	Pharmacognosie
Mr Ali Nouhoum DIALLO	Médecine interne
Mr Aly GUINDO	Gastro-Entérologie
Mr Mamadou M. KEITA	Pédiatrie
Mr Siné BAYO	Anatomie-Pathologie-Histoembryologie

**LISTE DU PERSONNEL ENSEIGNANT PAR D.E.R. & PAR
GRADE**

D.E.R. CHIRURGIE ET SPECIALITE CHIRURGICALE

1- PROFESSEURS

Mr Abdel Karim KOUMARE	Chirurgie Générale
Mr Sambou SOUMARE	Chirurgie Générale
Mr Abdou Alasane TOURE	Orthopédie – Traumatologie
Mr Kalilou OUATTARA	Urologie
Mr Amadou DOLO	Gynéco Obstétrique
Mr Alhousseini Ag MOHAMED	O.R.L.
Mme SY Assitan SOW	Gynéco-Obstétrique

Mr Salif DIAKITE
Mr Abdoulaye DIALLO
Mr Djibril SANGARE
Mr Abdel Kader TRAORE dit DIOP

Gynéco-Obstétrique
Anesthésie-Réanimation
Chirurgie Générale , Chef de D.E.R.
Chirurgie Générale

2- MAÎTRES DE CONFERENCES

Mr Abdoulaye DIALLO
Mr Gangaly DIALLO
Mr Mamadou TRAORE
Mr Filifing SISSOKO
Mr Sekou SIDIBE
Mr Abdoulaye DIALLO
Mr Tiéman COULIBALY
Mme TRAORE J. THOMAS
Mr Mamadou L.DIOMBANA
Mme DIALLO Fatimata S. DIAKITE
Mr Nouhoum ONGOIBA
Mr Sadio YENA
Mr Yousouf COULIBALY

Ophtalmologie
Chirurgie Viscérale
Gynéco-Obstétrique
Chirurgie Générale
Orthopédie – Traumatologie
Anesthésie-Réanimation
Orthopédie – Traumatologie
Ophtalmologie
Stomatologie
Gynéco-Obstétrique
Anatomie & Chirurgie Générale
Chirurgie Thoracique
Anesthésie-Réanimation

3- MAÎTRES ASSISTANTS

Mr Issa DIARRA
Mr Samba Karim TIMBO
Mme TOGOLA Fanta KONIPO
Mr Zimogo Zié SANOGO
Mme Diénéba DOUMBIA
Mr Zanafon OUATTARA
Mr Adama SANGARE
Mr Sanoussi BAMANI
Mr Doulaye SACKO
Mr Ibrahim ALWATA
Mr Lamine TOURE
Mr Mady MACALOU
Mr Aly TEMBELE
Mr Niani MOUNKORO
Mr Tiemoko D. COULIBALY
Mr Souleymane TOGORA
Mr Mouhamed KEITA
Mr Bouraïma MAIGA
Mr Youssouf SOW
Mr Djibo Mahamane DIANGO
Mr Moustapha TOURE

Gynéco-Obstétrique
O.R.L.
O.R.L.
Chirurgie Générale
Anesthésie-Réanimation
Urologie
Orthopédie – Traumatologie
Ophtalmologie
Ophtalmologie
Orthopédie – Traumatologie
Ophtalmologie
Orthopédie – Traumatologie
Urologie
Gynéco-Obstétrique
Odontologie
Odontologie
O.R.L.
Gynéco-Obstétrique
Chirurgie Générale
Anesthésie-Réanimation
Gynécologie

D.E.R. DE SCIENCES FONDAMENTALES

1. PROFESSEURS

Mr Daouda DIALLO	Chimie Générale & Minérale
Mr Amadou DIALLO	Biologie
Mr Moussa HARAMA	Chimie Organique
Mr Ogobara DOUMBO	Parasitologie-Mycologie
Mr Yénimingué Albert DEMBELE	Chimie Organique
Mr Anatole TOUNKARA	Immunologie
Mr Bakari M. CISSE	Biochimie
Mr Abdourahamane S. MAIGA	Parasitologie
Mr Adama DIARRA	Physiologie
Mr Massa SANOGO	Chimie Analytique
Mr Mamadou KONE	Physiologie

2. MAÎTRES DE CONFERENCES

Mr Amadou TOURE	Histiembryologie
Mr Flabou BOUGOUDOGO	Bactériologie-Virologie
Mr Amagana DOLO	Parasitologie Chef de D.E.R
Mr Mahamadou CISSE	Biologie
Mr Sékou F. M. TRAORE	Entomologie médicale
Mr Abdoulaye DABO	Malacologie, Biologie Animale
Mr Ibrahim I. MAIGA	Bactériologie-Virologie

3. MAÎTRES ASSISTANTS

Mr Lassana DOUMBIA	Chimie Organique
Mr Mounirou BABY	Hématologie
Mr Mahamadou A. THERA	Parasitologie-Mycologie
Mr Moussa Issa DIARRA	Biophysique
Mr Kaourou DOUCOURE	Biologie
Mr Bouréma KOURIBA	Immunologie
Mr Souleymane DIALLO	Bactériologie-Virologie
Mr Cheik Bougadari TRAORE	Anatomie-Pathologie
Mr Guimogo DOLO	Entomologie Moléculaire Médicale
Mr Mouctar DIALLO	Biologie Parasitologie
Mr Abdoulaye TOURE	Entomologie Moléculaire Médicale
Mr Boubacar TRAORE	Parasitologie Mycologie

4. ASSISTANTS

Mr Mangara M. BAGAYOGO
Mr Djibril SANGARE
Mr Boukary Y.SACKO
Mr Mamadou BA
Mr Moussa FANE

Entomologie Moléculaire Médicale
Entomologie Moléculaire Médicale
Biochimie
Biologie, Parasitologie Entomologie Médicale
Parasitologie Entomologie

D.E.R. DE MEDECINE ET SPECIALITES MEDICALES

1. PROFESSEURS

Mr Mamadou K. TOURE
Mr Mahamane MAIGA
Mr Baba KOUMARE
Mr Moussa TRAORE
Mr Issa TRAORE
Mr Hamar A. TRAORE
Mr Dapa Aly DIALLO
Mr Moussa Y. MAIGA
Mr Somita KEITA
Mr Boubacar DIALLO
Mr Toumani SIDIBE

Cardiologie
Néphrologie
Psychiatrie Chef de D.E.R.
Neurologie
Radiologie
Médecine Interne
Hématologie
Gastro-entérologie-Hépatologie
Dermato-Léprologie
Cardiologie
Pédiatrie

2. MAÎTRES DE CONFERENCES

Mr Bah KEITA
Mr Abdel Kader TRAORE
Mr Siaka SIDIBE
Mr Mamadou DEMBELE
Mr Mamady KANE
Mr Sahare FONGORO
Mr Bakoroba COULIBALY
Mr Bou DIAKITE
Mr Bougouzié SANOGO
Mme SIDIBE Assa TRAORE
Mr Adama D. KEITA

Pneumo-Phtologie
Médecine Interne
Radiologie
Médecine Interne
Radiologie
Néphrologie
Psychiatrie
Psychiatrie
Gastro-entérologie
Endocrinologie
Radiologie

3. MAÎTRES ASSISTANTS

Mme TRAORE Mariam SYLLA
Mme Habibatou DIAWARA
Mr Daouda K. MINTA
Mr Koussoum SANOGO
Mr Seydou DIAKITE
Mr Arouna TOGORA
Mme DIARRA Assétou SOUCKOU

Pédiatrie
Dermatologie
Maladies Infectieuses
Cardiologie
Cardiologie
Psychiatrie
Médecine Interne

Mr Boubacar TOGO
Mr Mahamadou TOURE
Mr Idrissa A. CISSE
Mr Mamadou B. DIARRA
Mr Anselme KONATE
Mr Moussa T. DIARRA
Mr Souleymane DIALLO
Mr Souleymane COULIBALY
Mr Sounkalo DAO
Mr Cheick Oumar GUINTO

Pédiatrie
Radiologie
Dermatologie
Cardiologie
Hépto Gastro-Entérologie
Hépto Gastro-Entérologie
Pneumologie
Psychiatrie
Maladies Infectieuses
Neurologie

D.E.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

1.PROFESSEURS

Mr Boubacar Sidiki CISSE
Mr Gaoussou KANOUTE
Mr Ousmane DOUMBIA
Mr Elimane MARIKO

Toxicologie
Chimie analytique, Chef de D.E.R.
Pharmacie Chimie
Pharmacologie

2.MAÎTRES DE CONFERENCES

Mr Drissa DIALLO
Mr Alou KEITA
Mr Benoît Yaranga KOUMARE
Mr Ababacar I. MAIGA

Matière Médicale
Galéniques
Chimie Analytique
Toxicologie

3.MAÎTRES ASSISTANTS

Mme Rokia SANOGO
Mr Yaya KANE
Mr Saïbou MAIGA
Mr Ousmane KOITA
Mr Yaya COULIBALY

Pharmacognosie
Galénique
Législation
Parasitologie Moléculaire
Législation

D.E.R. DE SANTE PUBLIQUE

1.PROFESSEUR

Mr Sanoussi KONATE

Santé Publique, Chef de D.E.R.

2. MAÎTRE DE CONFERENCES

Mr Moussa A. MAIGA

Santé Publique

3. MAÎTRES ASSISTANTS

Mr Adama DIAWARA	Santé Publique
Mr Hamadoun SANGHO	Santé Publique
Mr Massambou SACKO	Santé Publique
Mr Alassane A. DICKO	Santé Publique
Mr Mamadou Souncalo TRAORE	Santé Publique
Mr Hammadoun Aly SANGO	Santé Publique
Mr Seydou DOUMBIA	Epidémiologie
Mr Samba DIOP	Anthropologie Médicale
Mr Akory AG IKNANE	Santé Publique

4. ASSISTANTS

Mr Oumar THIERO	Biostatistique
Mr Seydou DIARRA	Anthropologie Médicale

CHARGES DE COURS & ENSEIGNANTS VACATAIRES

Mr N'Golo DIARRA	Botanique
Mr Boubou DIARRA	Bactériologie
Mr Salikou SANOGO	Physique
Mr Boubacar KANTE	Galénique
Mr Souleymane GUINDO	Gestion
Mme DEMBELE Sira DIARRA	Mathématiques
Mr Modibo DIARRA	Nutrition
Mme MAIGA Fatoumata SOKONA	Hygiène du milieu
Mr Mahamadou TRAORE	Génétique
Mr Yaya COULIBALY	Législation
Mr Lassine SIDIBE	Chimie organique

ENSEIGNANTS EN MISSION

Pr. Daouda BA	Bromatologie
Pr. Babacar FAYE	Pharmacodynamie
Pr. Mounirou CISS	Hydrologie
Pr. Amadou Papa DIOP	Biochimie
Pr. Lamine GAYE	Physiologie

DEDICACES

*"Mon âme bénit le Seigneur et
n'oublie aucun de ses bienfaits"
Ps 103 : 1,2*

Je dédie ce travail :

☛ **AU DIEU TOUT-PUISSANT** qui a su conduire mes pas chaque jour, combler mes besoins et sans qui, ce travail n'aurait jamais été fait.

« *Le Seigneur est mon berger je ne manquerai de rien .»*

Ps 23 :1-3

☛ **A ma défunte grand-mère AJAVON Anasthasie**

Je ne saurais oublier tous les bons moments que nous avons passés ensemble. Ton affection, ta tendresse et ton soutien moral m'ont beaucoup manqués. Tu resteras à jamais gravée dans ma mémoire.

Puisse ce travail te rendre hommage.

☛ **A mon Papa**

Tu n'as ménagé aucun effort pour notre éducation. J'ai pu réaliser que ta rigueur, ton abnégation au travail et ton intégrité sont des vertus essentielles. Ton amour et ton soutien ne m'ont jamais fait défaut.

Ce travail est le fruit de tes efforts et de tes sacrifices. Sois rassuré de ma profonde affection et de mon sincère remerciement.

☛ **A ma maman**

Merci pour tous les sacrifices que tu as toujours consentis pour notre bonheur et notre réussite.

Femme vertueuse, courageuse et vaillante, tu resteras toujours la source de mon inspiration.

Trouve à travers ce travail les récoltes de tes nombreuses années de semences.

Profond attachement et amour filial.

☛ **A mon frère Joël**

Ce travail est le tien. Qu'il te serve d'exemple à surpasser et t'amène à toujours croire à l'aboutissement certain de tout ce que tu entreprendras.

Trouve ici l'expression de mon profond attachement.

☛ **A mon bien aimé AGUIDI Rolland**

Tu as toujours su me soutenir et me rassurer dans les moments de doute. Reçois ici l'assurance de ma sincère reconnaissance et de mon infini amour.

Puisse Dieu nous unir davantage et nous combler de bonheur.

☛ **A mes oncles et tantes**

Pour votre soutien et l'intérêt que vous avez toujours accordé à ma personne, profonde gratitude.

☛ **A mes cousins et cousines**

Trouvez ici l'assurance de mon profond attachement.

☛ **A M^{eur} et M^{me} AHOUADI Jean Marie Placide**

En reconnaissance de l'affection et de l'attention dont j'ai été l'objet de votre part, veuillez accepter ce travail comme le vôtre. Que Dieu vous assiste dans toutes vos entreprises et qu'il vous comble de ses bienfaits.

☛ **A M^{eur} et M^{me} AHOUADI Rémi**

Pour vos multiples conseils et soutien. Recevez ce travail en témoignage de ma reconnaissance.

Puisse Dieu vous combler de bénédiction.

☛ **A Hugues VIGAN et Tonia AHOUADI**

Plus que des cousins, vous êtes pour moi de véritables frères et amis. Ce travail est le vôtre ; qu'il soit pour vous l'expression de mon attachement.

Remerciements

© **Au Mali, Terre d'accueil et au peuple malien.**

Vous avez formé le Docteur que je suis aujourd'hui. J'ai appris de vous la simplicité et l'hospitalité.

Merci

© **A la communauté des élèves, étudiants et stagiaires béninois au Mali.**

Pour l'unité et l'entraide dont elle a toujours su faire preuve permettant ainsi à chacun de ses membres de se sentir en famille sur une terre étrangère.

© **A mes camarades de promotion**

Le chemin ensemble a été long et semé d'embûches. Nous sommes à présent à la croisée des chemins. Puisse nous faire fructifier nos labeurs et en faire profiter nos pays respectifs.

© **A tous mes amis de Bamako**

Pour de bons moments que nous avons partagés, reconnaissance.

© **Au personnel du laboratoire CIRSAR (Centre d'Information et de Recherche en Santé de la Reproduction)**

Pour l'amour et la rigueur au travail dont il fait preuve.

© **A tous les étudiants mémorants au laboratoire CIRSAR : Aline, Damien, Diane, Inès, Roberte.**

La collaboration a été enrichissante.

Brillante carrière à vous tous.

© **Au personnel du Laboratoire de Pharmacognosie et des Huiles Essentielles (LAPHE)**

Merci pour votre disponibilité et votre gentillesse.

© **A madame AHOKPE Mélanie** du laboratoire de biochimie de la Faculté des Sciences de Santé (FSS)

Infiniment merci.

© **A madame ANAGO Eugénie**

Pour votre contribution dans la réalisation de ce travail.

© **Au Professeur LOKO Frédéric**

Vos qualités de formateur et votre rigueur scientifique sont remarquables. J'ai apprécié à plus d'un titre votre pragmatisme, votre humilité, votre constante disponibilité et votre ouverture aux débats sans distinction de niveau de formation. Ce travail est le fruit du suivi sans relâche dont vous avez fait preuve à mon égard. Soyez assuré de ma gratitude et de mon profond respect.

© **Au Professeur Moudachirou Mansourou**

Vous m'avez acceptée dans votre laboratoire.

Votre contribution à l'élaboration de ce travail est inestimable. Soyez-en remercié.

© **Au Professeur Gbénou Joachim**

Vous n'avez ménagé aucun effort dans la réalisation de ce travail. Votre simplicité et votre amour du travail sont des qualités qui m'ont marquée.

Recevez ici l'expression de mes sincères remerciements.

© **Au Docteur Gbaguidi Fernand**

Votre enthousiasme naturel et votre ardeur au travail m'ont beaucoup impressionnée. Vous avez su vous rendre utile et disponible pour m'aider dans la réalisation de ce travail.

Merci infiniment.

© **A mon maître et Directeur de Thèse, le Professeur Drissa DIALLO**

Vous m'avez marquée tout au long de ma formation par la qualité de votre enseignement et votre rigueur scientifique. Votre simplicité et votre sens de travail bien fait font de vous un grand homme. Malgré vos multiples occupations, vous avez accepté de diriger cette thèse et vous n'avez ménagé aucun effort pour la parfaire.

Recevez Cher Maître, l'expression de ma profonde reconnaissance.

© **A notre maître et président du jury, le Professeur Bakary CISSE**

Cher maître, c'est un grand honneur que vous nous faites en acceptant de présider ce jury malgré vos lourdes responsabilités.

Nous avons bénéficié tout au long de nos études d'un enseignement de qualité. Votre modestie, votre simplicité et votre attachement au partage scientifique ont forcé notre admiration; recevez cher maître nos sentiments sincères de reconnaissance et de profond respect.

© **A notre maître et juge, le professeur Elimane MARIKO**

Vous nous faites honneur en acceptant de siéger dans notre jury de thèse. Vos qualités scientifiques et humaines sont incommensurables. Vous nous avez mis à l'aise par votre grande modestie. Nous vous remercions d'avoir accepté de participer à l'amélioration de la qualité de ce travail. Recevez cher maître l'expression de notre reconnaissance.

© **A mon maître et juge, le Professeur Ibrahim I. MAIGA**

Cher maître vous nous avez fait un grand honneur en acceptant de siéger dans ce jury de thèse. Nous avons été marqué par votre simplicité et votre compétence professionnelle qui ne sont plus à rappeler. Nous éprouvons pour vous un très grand respect et une admiration profonde. Permettez-nous cher maître de vous exprimer ici toute notre reconnaissance.

TABLEAUX & FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I	Espèces végétales à action antimicrobienne.....	8
Tableau II	Caractères biochimiques de <i>E. coli</i>	16
Tableau III	Mécanisme de résistance des BGN aux antibiotiques.....	30
Tableau IV	Réactions de mise en évidence des stéroïdes et triterpènes	44
Tableau V	Réactions de mise en évidence des composés Polyphénoliques	47
Tableau VI	Détection de la β -lactamase par la méthode acidimétrique de Syre.	61
Tableau VII	Mise en évidence d'une activité pénicillinase et BLSE.....	68
Tableau VIII	Mise en évidence de l'activité β -lactamase par la méthode en UV..	70
Tableau IX	Gamme de dilutions du substrat-réactif	71
Tableau X	Concentration de la Benzylpénicilline dans le milieu réactionnel....	72
Tableau XI	Criblage phytochimique des organes (feuilles, écorces et racines) .. de <i>T. superba</i>	76
Tableau XII	Rendement des extraits totaux (A) et des extraits par polarités croissantes de solvants (B)	79
Tableau XIII	Rendement des extraits spécifiques.....	80
Tableau XIV	CMI des extraits totaux d'organes	84
Tableau XV	CMI des extraits par polarités croissantes de solvants sur la souche .. de <i>E.coli</i> productrice de BLSE	84
Tableau XVI	CMI des extraits spécifiques.....	85
Tableau XVII	Gamme d'étalonnage du rouge de phénol.....	87
Tableau XVIII	Variations des DO par minute du rouge de phénol au cours de l'hydrolyse de la pénicillinase et de la BLSE	88
Tableau XIX	Gamme d'étalonnage de la Benzylpénicilline.....	92
Tableau XX	Détermination des K_m et V_{max} de la pénicillinase.....	96
Tableau XXI	Détermination des K_m et V_{max} de la BLSE.....	97
Tableau XXII	Inhibition de la pénicillinase et de la BLSE de <i>E. coli</i> par les extraits totaux éthanoliques d'écorces de <i>Terminalia superba</i>	99

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure des pénames17
Figure 2 : Structure des céphèmes.....	19
Figure 3 : Structure des monobactames.....	.20
Figure 4 : Sites d'attaques des enzymes hydrolytiques sur les molécules de β – lactamines	27
Figure 5 : Protocole de mise en évidence des composés réducteurs.....	45
Figure 6 : Protocole de mise en évidence des dérivés anthracéniques.....	49
Figure 7 : Mise en évidence des alcaloïdes – test de MAYER.....	50
Figure 8 : Mise en évidence des alcaloïdes – test de DRAGENDORFF.....	51
Figure 9 : Protocole d'extraction éthanolique.....	.55
Figure 10 : Protocole d'extraction aqueuse.....	.56
Figure 11 : Protocole d'extractions par polarités croissantes de solvant.....	.56
Figure 12 : Protocole d'extraction spécifique des dérivés anthracéniques.....	.57
Figure 13 : Protocole d'extraction spécifique des coumarines.....	57
Figure 14 : Protocole d'extraction spécifique des tanins.....	58
Figure 15 : Dilution de SB ₁	62
Figure 16 : Dilution de I ₁ ou T ₁	63
Figure 17 : Gamme de dilutions de la SM d'extraits à 100 mg/mL.....	64
Figure 18 : Réalisation des suspensions bactériennes.....	64
Figure 19 : Activité pénicillinase et BLSE.....	67
Figure 20 : CCM des extraits d'organes de <i>Terminalia superba</i> pour la mise en évidence des coumarines	77
Figure 21 : CCM des extraits d'organes de <i>Terminalia superba</i> pour la mise en évidence des dérivés anthracéniques	78
Figure 22 : Antibiogramme de la souche de <i>E. coli</i> productrice de..... pénicillinase.	81
Figure 23 : Antibiogramme de la souche de <i>E. coli</i> productrice de BLSE.....	82
Figure 24 : Droite d'étalonnage du substrat-réactif au rouge de phénol.....	87
Figure 25 : Spectre d'absorption dans l'UV de la Benzylpénicilline..... à 200 μ g/mL en Tampon phosphate 10 mM, pH 7,0	91
Figure 26 : Droite d'étalonnage de la Benzylpénicilline en Tampon..... phosphate 10 mM, pH 7,0....	92
Figure 27 : Profil d'élution de l'activité pénicillinase par chromatofocalisation	94
Figure 28 : Profil d'élution de l'activité BLSE par chromatofocalisation.....	94
Figure 29 : Détermination des Km et Vmax de la pénicillinase.....	96
Figure 30 : Détermination des Km et Vmax de la BLSE.....	97
Figure 31 : Thermostabilité de la pénicillinase à 50° C.....	98
Figure 32 : Thermostabilité de la BLSE à 50° C.....	98

Abréviations & Sigles

- **AE** : Activité enzymatique
- **AMC** : Amoxicilline + Acide clavulanique
- **AMX** : Amoxicilline
- **ATM** : AmoxicillineAztréonam
- **ATCC**: American Type Culture Collection
- **β**: Bêta
- **BGN** : Bacilles à Gram Négatif
- **BLSE** : Bêta Lactamase à Spectre Elargi
- **BTS** : Bouillon Trypticase Soja
- **C** : Carbone
- λ : longueur d'onde
- **CARB** :Carboxypénicilline
- **CCM** : Chromatographie sur Couche Mince
- **CF** : Céfalotine
- **C₃G** : Céphalosporine de troisième Génération
- **CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice
- **CIRSAR** : Centre d'Information et de Recherche en Santé de Reproduction
- **Coll** : Collaborateurs
- **CO₂** : Dioxyde de carbone
- **CTX** : Céfotaxime
- **CRO** : Céftriazone
- **CZ** : Céfazoline
- **DO** : Densité Optique
- Δ **DO**: Variation de la Densité Optique
- ***E. coli*** : *Escherichia coli*
- **EMB** : Eosin Methylene Blue
- **HCl** : Acide Chlorhydrique
- **H₂S**: Sulfure d'hydrogène
- **IPM** : Imipénem
- **IRT** : Inhibitor Resistant TEM

- **ISBA** : Institut des Sciences Biomédicales Appliquées
- **K_m** : Constante de Michaelis Menten
- **LAPHE** : Laboratoire de Pharmacognosie et des Huiles Essentielles
- **LPS** : Lipopolysaccharide
- **M** : Molaire
- **mL** : Millilitre
- **min** : Minute
- **MH** : Mueller Hinton
- **mM** : Millimolaire
- **μmol** : Micromole
- **μM** : Micromolaire
- **μm** : Micromètre
- **μL** : Microlitre
- **N** : Normal
- **nm** : Nanomètre
- **NaOH 1N** : Hydroxyde de sodium normal
- **NCCLS** : National Committee for Clinical Laboratory Standard
- **NH₄OH** : Ammoniaque
- **OMS** : Organisation Mondiale de la Santé
- **ONPG**: Ortho-Nitro-Phényl D Galactopyranoside
- **OXA** : Oxacilline
- **PB** : Polybuffer
- **PBE**: Polybuffer Exchanger
- **PEG**: Polyéthylène Glycol
- **PLP** : protéines Liant les Pénicillines
- **PSE** : Pseudomonas Specific Enzyme
- **pH** : Potentiel d'hydrogène
- **pHi** : pH isoélectrique
- **PM** : Poids Moléculaire
- **S**: Smooth

- **R** : Rough
- **s** : Seconde
- **SB** : Suspension Bactérienne
- **SM** : Solution mere
- **SS** : *Salmonella Shigella*
- **SHV** : Sulphydryl Variable
- **[S]** : Concentration de Substrat
- **TDA** : Tryptophane Désaminase
- **TEM** : Temoniera
- **IRT** : Inhibitor Resistant TEM
- **T°** : Température
- **t/min** : tour par minute
- ***T. superba*** : *Terminalia superba*
- **UI** : Unité Internationale
- **UNICEF** : Fonds des Nations Unies pour l'Enfance
- **UV** : Ultra Violet
- **Vi** : Vitesse initiale
- **VP**: Voges Prokaüer
- **Vmax** : Vitesse maximale

Sommaire

Introduction.....	1
1°) Généralités.....	3
2°) Cadre et méthode d'étude.....	39
3°) Résultats.....	75
4°) Discussion.....	100
Conclusion et Recommandations.....	110
Références	113
Annexes.....	129

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 [16 ; 45].

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).

Parmi ces enzymes inactivatrices, les β -lactamases qui entraînent la perte de l'activité antibactérienne de la β -lactamine occupent une place remarquable. L'émergence des souches d'entérobactéries productrices de β -lactamase à spectre élargi (BLSE) constitue un problème préoccupant, puisque ces germes sont responsables d'infections nosocomiales, de plus en plus fréquentes dans certains services hospitaliers [41; 58].

Les β -lactamines occupent une place importante parmi les différentes familles d'antibiotiques utilisés 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 de la pharmacopée pourraient répondre à ces exigences.

La biodiversité végétale africaine est un atout majeur. Depuis plus de deux décennies, la recherche en médecine traditionnelle et en pharmacognosie a permis de répertorier de multiples espèces végétales et leurs vertus thérapeutiques [3]. Cependant, les acquis de la recherche concernant les espèces végétales à activité antibactérienne sont actuellement faibles. Il s'agit essentiellement des données afférentes à leur composition chimique, aux principes actifs responsables de cette activité antibactérienne et aux essais pharmacologiques et galéniques.

Des travaux effectués antérieurement dans notre laboratoire d'accueil ont permis d'isoler des souches de *E. coli* productrices de pénicillinase, de céphalosporinase et de BLSE. Certaines de ces souches sont multirésistantes à plusieurs antibiotiques commercialisés.

Terminalia superba Engl. et Diels (*Combretaceae*) est une espèce végétale africaine couramment utilisée en médecine traditionnelle pour le traitement de maladies infectieuses (buccales, intestinales, broncho-pulmonaires etc.). [12; 44]

Il nous a paru important de mettre en évidence l'action inhibitrice de *Terminalia superba* sur les souches de *E. coli* productrices de β -lactamases ; de préciser si cette propriété inhibitrice relève d'une banale action antiseptique ou d'une activité antibiotique stricte, incluant l'inhibition de la β -lactamase secrétée par *E.coli*. C'est dans cette optique que nous avons entrepris l'extraction de la β -lactamase (pénicillinase et BLSE) de deux souches de *E.coli*, afin d'en étudier les caractéristiques.

Notre objectif général est de mettre en évidence l'action inhibitrice d'extraits d'organes de *Terminalia superba* sur deux souches de *E.coli* productrices respectivement de BLSE et de pénicillinase et d'étudier quelques propriétés biochimiques de ces deux β -lactamases.

Nos objectifs spécifiques sont :

1- Identifier les différents groupes chimiques présents dans les écorces, feuilles et racines de *Terminalia superba*.

2- Déterminer les rendements des extractions.

3- Déterminer les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) des extraits d'organes de *Terminalia superba* obtenus sur deux souches de *E. coli* productrices de pénicillinase et de BLSE respectivement.

4- Extraire la pénicillinase et la BLSE de ces deux souches et déterminer l'activité en spectrophotométrie de la pénicillinase et de la BLSE extraites de ces deux souches.

5- Identifier les caractéristiques biochimiques (thermostabilité, K_m , V_{max} , pH isoélectrique) de la BLSE et de la pénicillinase.

6- Caractériser l'inhibition de la pénicillinase et de la BLSE par les extraits d'organes de *Terminalia superba*.

1- Généralités

1.1 DONNEES ETHNOBOTANIKES, ETHNOPHARMACOLOGIKES ET CHIMIKES SUR *TERMINALIA SUPERBA*

1.1.1. Description botanique et répartition géographique

1.1.1.1. Systématique

Embranchement.....	Spermaphytes ou Phanérogames
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones ou Magnoliopsida
Sous classe.....	<i>Rosidae</i>
Ordre	<i>Myrtales</i>
Famille.....	<i>Combretaceae</i>
Genre	<i>Terminalia</i>
Espèce.....	<i>Terminalia superba</i> [24]

Voici quelques noms vernaculaires de *Terminalia superba* :

- en FON : AZINII ou AZI IN TIN.
- En YORUBA et NAGO : AFAN ou AFARA ou IRE ou IDIGBO ou encore IDI IGBO [6]

1.1.1.2. Description botanique

Terminalia superba est un arbre haut de 25 à 50 m, avec des feuilles alternes groupées au sommet des rameaux.

La feuille possède 7 à 8 nervures latérales très arquées. Sa surface est glabre à l'âge adulte ; la nervure médiane peut conserver une pubescence roux ferrugineux. Le limbe obovale a une longueur de 12 à 18 cm et une largeur de 5 à 8 cm. La base est en coin. Le sommet est largement arrondi puis terminé par une pointe brusque et aiguë, longue de 5 à 10 mm.

Le pétiole, long de 2 à 7 cm, présente une pubescence roux-ferrugineux dans le jeune âge avec souvent deux glandes, à la partie médiane ou supérieure. A l'âge adulte il prend facilement un revêtement cireux blanchâtre.

Les fleurs, en épis axillaires, peu denses et longues de 7 à 15 cm, sont situées à la base des jeunes feuilles.

Les fruits sont ailés, larges de 4 à 7 cm, hauts de 15 mm et ont un aspect de pyramide écrasée. [12]

Au Bénin, l'arbre porte ses fruits au mois d'Août. [6]

1.1.1.3. Répartition géographique

Terminalia superba est un arbre très répandu de la Guinée jusqu'au Congo ; il fut introduit en Casamance comme arbre d'avenue. Au Bénin, il est surtout retrouvé dans la région de Pobè. [12; 6]

1.1.2. Usages thérapeutiques

Ce sont surtout les écorces qui sont employées en pharmacopée indigène. Les Sotho du Sénégal utilisent la poudre d'écorces contre le diabète sucré [4 ; 5]. Par ailleurs, les extraits par le méthanol et le chlorure de méthylène (1:1) de l'écorce de tige ont été évoqués antérieurement comme ayant des activités antidiabétiques. [37]

Les écorces auraient également des propriétés émétiques ou expectorantes. Seules, ou en association, elles servent à soigner les affections broncho-pulmonaires. La macération d'écorces est utilisée contre les oedèmes et les douleurs généralisées [6]. Elle est aussi utilisée dans le traitement de la blennorragie et de la diarrhée [44].

La tisane d'écorces est anti-dysentérique. On l'administre aussi aux femmes stériles ou menacées de fausse-couche, ou à celles qui présentent des troubles ovariens. [12]

La face interne des écorces, raclée et macérée dans de l'eau, et la pulpe de feuilles sont employées en bains de bouche contre les gingivites et les aphtes [12; 44].

L'extrait méthanolique de *Terminalia superba* induit une dilatation de l'aorte thoracique [27]. Au Niger et au Mali, cette plante est utilisée dans le traitement des hépatites [4; 5]. Elle a également des propriétés trypanocides [2].

La pulpe de feuilles est aussi utilisée contre les rhumatismes, les oedèmes, la toux et l'angine. Le suc de feuilles soigne la conjonctivite [44].

Autres usages

Dans certaines régions, on emploie les écorces de *Terminalia superba* pour teindre en noir les feuilles de *Pandanus* servant à la fabrication des nattes. *Terminalia superba* est un bois jaunâtre, ou jaune olivâtre, dur et facile à travailler mais se fendant facilement. Il peut servir dans la construction et l'ameublement, et pour la fabrication de petites embarcations. [12]

1.1.3. Composition chimique

Terminalia superba appartient à la sous-classe des *Rosidae*. Cette sous-classe regroupe des arbres et des herbes qui possèdent souvent des tanins, des alcaloïdes divers mais ne recèle pas le groupe benzylisoquinoléine ni la bétalaïne. [24]

L'extrait brut de tige 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) [8; 38; 56]. La présence d'alcaloïdes a été signalée par Burkill [19].

A l'instar de plusieurs espèces végétales rencontrées en zone tropicale, *Terminalia superba* contient des tanins (essentiellement des tanins catéchiques) [28]. Par ailleurs, il contient des gommes polysaccharidiques riches en acides uroniques et en oses. [1]

1.2. QUELQUES ESPECES VEGETALES DE LA PHARMA- COPEE AFRICAINE UTILISEES AU COURS DES INFECTIONS ET PARASITOSE

Tableau I: Espèces végétales à action antimicrobienne [44; 3]

No	Espèces Végétales	Famille	Organe utilisé	Usages thérapeutiques
1.	<i>Carapa procera</i>	<i>Meliaceae</i>	Fruit	Gonococcie Syphilis
2.	<i>Piptadeniastrum africanum</i>	<i>Mimosaceae</i>	Ecorce	Blennorragie Pneumonie
3.	<i>Boswellia dalzielii</i>	<i>Burseraceae</i>	Ecorce	Syphilis
4.	<i>Ceiba pentadra</i>	<i>Bombacaceae</i>	Ecorce	Conjonctivite Gonococcie
5.	<i>Enantia chloranta</i>	<i>Annonaceae</i>	Ecorce	Tuberculose
6.	<i>Voacanga africana</i>	<i>Apocynaceae</i>	Ecorce	Diarrhée Gonococcie
			Graine	Carie dentaire Diarrhée Gonococcie Dysenterie
7.	<i>Flacourtia flaverscens</i>	<i>Flacourtiaceae</i>	Feuille	Syphilis
8.	<i>Ficus exasperata</i>	<i>Moraceae</i>	Feuille	Conjonctivite Gonococcie Tuberculose
9.	<i>Trema orientalis</i>	<i>Ulmaceae</i>	Feuille	Gonococcie
10.	<i>Aloe barteri</i>	<i>Aloeaceae</i>	Feuille	Dysenterie
11.	<i>Alstonia boonei</i>	<i>Apocynaceae</i>	Ecorce	Diarrhée
12.	<i>Caloncoba welwitschii</i>	<i>Flacourtiaceae</i>	Ecorce	Pneumonie
13.	<i>Annona senegalensis</i>	<i>Annonaceae</i>	Feuille	Dysenterie Diarrhée Conjonctivite

Tableau I : Espèces végétales à action antimicrobienne (suite)

N°	Espèces Végétales	Famille	Organe utilisé	Usages thérapeutiques
14.	<i>Dioscorea dumetorum</i>	<i>Dioscoreaceae</i>	feuille	Diarrhée Helminthiase
15.	<i>Fimbristylis hispidula</i>	<i>Cyperaceae</i>	Plante entière	Dysenterie amibienne
16.	<i>Secamone afzelii</i>	<i>Alsclepidaceae</i>	Feuille	Vaginite
17.	<i>Mangifera indica</i>	<i>Anacardiaceae</i>	Pulpe de fèves	Ascaridiose Oxyurose
18.	<i>Pleiocarpa pycnantha</i>	<i>Apocynaceae</i>	Feuille	Ascaridiose
19.	<i>Asystasia gangetica</i>	<i>Acanthaceae</i>	Feuille	Blennorragie
20.	<i>Cremaspora triflora</i>	<i>Rubiaceae</i>	Feuille	Parasitoses intestinales
21.	<i>Indigofera astragalina</i>	<i>Papilionaceae</i>	Feuille	Parasitoses intestinales
22.	<i>Pterocarpus erinaceus</i>	<i>Papilionaceae</i>	Ecorce	Dysenterie, dystocies
23.	<i>Desmodium ramosissimum</i>	<i>Papilionaceae</i>	Feuille	diarrhée, dysenterie
24.	<i>Dissotis rotundifolia</i>	<i>Melastomatoceae</i>	Feuille	Diarrhée, helminthiase
25.	<i>Spigelia anthelmia</i>	<i>Loganiaceae</i>	Tige	Parasitoses intestinales
26.	<i>Segurinega virosa</i>	<i>Euphobiaceae</i>	Racine	Candidoses, rougeole
27.	<i>Maerua angolensis</i>	<i>Capparidaceae</i>	Tige	Dysenterie amibienne
28.	<i>Spondias mombin</i>	<i>Anacardiaceae</i>	Feuille	Varicelle, candidoses, Blennorragie
29.	<i>Synedrella nodiflora</i>	<i>Asteraceae</i>	Feuille	Conjonctivite
30.	<i>Parquetina nodiflora</i>	<i>Periplocaceae</i>	Feuille	Diarrhée

1.3. PROPRIETES BIOLOGIQUES ET PHARMACOLOGIQUES DE QUELQUES COMPOSES PHYTOCHIMIQUES

Plusieurs groupes phytochimiques ont été identifiés dans quelques espèces végétales étudiées par BRUNETON J. [17] et COWAN M. [23] et des exemples de composés chimiques ont été précisés.

1.3.1. Les alcaloïdes

Ce sont des composés azotés plus ou moins basiques, se trouvant à l'état naturel sous forme de sels. Ce sont des substances antipaludiques (quinine), anti-tumorales (vinblastine), anesthésiques locales (cocaïne) et stimulantes (caféine).[17]

1.3.2. Les anthocyanes

Il s'agit des pigments végétaux dont la couleur varie en fonction du pH du milieu. Les anthocyanes possèdent des propriétés vitaminiques permettant de les utiliser dans les troubles liés à l'insuffisance veineuse et à la fragilité capillaire. Ils interviennent aussi dans l'amélioration de la vision crépusculaire. [17]

1.3.3. Les anthracénosides

Ils sont caractérisés par la présence de composés phénoliques plus ou moins rattachés à l'anthracène. Les dérivés anthracéniques sont responsables d'une activité laxative [17]. Les hétérosides anthracéniques sont ocytoxiques pour la femme enceinte. Certains hétérosides anthracéniques (Hypericine), décrits comme antidépresseurs, auraient des propriétés antimicrobiennes. [23]

1.3.4. Les coumarines

Ce sont des lactones des acides o-hydroxy-z-cinnamiques. Elles interviennent en cas d'insuffisance veino-lymphatique, dans les troubles de la

sénescence cérébrale et comme vasodilatatrice coronarienne. Elles possèdent des propriétés anti-œdémateuses, immunostimulantes et cytotoxiques [17]. On reconnaît également aux coumarines des propriétés antimycosiques sur *Candida albicans*. [23]

1.3.5. Les flavonoïdes

Ce sont des composés polyphénoliques responsables de la coloration des fleurs, de certains fruits et possédant aussi des propriétés thérapeutiques. On reconnaît aux flavonoïdes des propriétés antiplasmodiales (licocalcone A) [17], cytotoxiques, anticancéreuses, antimicrobiennes, antivirales, anti-inflammatoires, anti-âge, vitaminique P; on les utilise aussi en cas d'insuffisance veineuse. [17]

1.3.6. Les saponosides

Ce sont des hétérosides à génines stéroïdiques (C_{27}) ou triterpéniques (C_{30}) caractérisés principalement par leurs pouvoirs hémolytiques et tensioactifs. Les saponosides sont traditionnellement utilisés comme antitussifs et /ou expectorants, anti-inflammatoires et anti-œdémateux. Ils possèdent des activités antibactériennes, antifongiques, antiplasmodiales et molluscicides. [17]

1.3.7. Les tanins et polyphénols

Ce sont des composés polyphénoliques hydrosolubles capables de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et les protéines ; en précipitant les protéines, on les qualifie de facteur antinutritionnel. Ils possèdent des propriétés antibactériennes, antifongiques, cicatrisantes, antihypertensives, anti-diarrhéiques, veinotoniques et décongestionnantes ophtalmiques. 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. Certains tanins s'opposent à la mutagénicité cancérigène et à la transplantation des tumeurs expérimentales. [17]

1.3.8. Les triterpènes et stéroïdes

Ce sont des composés en C₃₀ issus de la cyclisation du squalène et se présentant sous la forme de tétra ou pentacyclique presque toujours hydroxylés en 3. Les composés terpéniques et stéroïdiques possèdent des propriétés antimalariques, cardiotoniques, contraceptives, anabolisantes et anti-inflammatoires. [17]

1.3.9. 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 (effet chronotrope négatif) par modification de la régulation neuro-végétative (effet indirect sympathomimétique). L'action dromotrope négative, d'origine cholinergique, se traduit par un ralentissement de la vitesse de conduction à la jonction auriculo-ventriculaire (d'où l'utilisation dans les troubles du rythme supraventriculaire). Il n'y a pas d'action sur la conduction intraventriculaire. [17]

1.4. *ESCHERICHIA COLI*

1.4.1- Historique

Isolé pour la première fois par **Théodor Von Escherich** en 1885, *Escherichia coli* est l'espèce bactérienne qui a été la plus étudiée par les fondamentalistes, pour des travaux de physiologie et de génétique.

Couramment appelée "colibacille", cette bactérie est connue depuis longtemps comme un banal commensal du tube digestif ou un indiscutable agent pathogène. [9; 29]

1.4.2- Définition

De la famille des *Enterobacteriaceae* issue de la tribu des *Escherichiae*, du genre *Escherichia*, *Escherichia coli* est un bacille à Gram négatif, mesurant 2 à 3 µm de long sur 0,3 µm de large [29; 11]. Il est souvent isolé, groupé par 2 ou plus rarement en amas [46].

Par ailleurs, il est asporulé, généralement mobile grâce à une ciliature péritriche ce qui le différencie d'une espèce très proche, *Alkalescens dispar* qui est immobile [11].

1.4.3- Habitat

Escherichia coli est un germe habituel de la flore intestinale des animaux et de l'Homme. On peut le retrouver également au niveau des muqueuses de ces derniers. De plus, il représente 80% de la flore intestinale aérobie de l'adulte. [29]

Par ailleurs, sa présence dans le milieu environnant ou dans les aliments signe toujours une contamination fécale. C'est pourquoi on procède systématiquement à sa détection dans les eaux d'alimentation (colimétrie). [25]

1.4.4- Pathogénie

Escherichia coli peut donner lieu à divers types d'infections qu'on peut regrouper en deux (2) catégories :

1.4.4.1. Infections extra-intestinales

Il peut s'agir :

❖ *Des 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 [29; 11].

❖ ***Des infections abdominales***

Escherichia coli est souvent responsable de suppurations péritonéales, biliaires, appendiculaires ou génitales. [25].

❖ ***Du choc endotoxinique***

Fièvre, collapsus et hémorragies sont les symptômes principaux du redoutable choc septique qu'engendre la lyse massive dans l'organisme de bactéries à Gram négatif qui libèrent de grandes quantités de LPS (lipopolysaccharide). [25]

❖ ***Des méningites et bactériémies du nouveau-né et du nourrisson***

30 % environ des méningites néonatales sont dues à *E. coli*. Elles s'accompagnent presque toujours d'un état bactériémique voire septicémique [25].

Escherichia coli peut également entraîner d'autres infections localisées au niveau des voies respiratoires, de la sphère oto-rhino-laryngologique ou de la peau [11].

1.4.4.2- Infections intestinales

Plusieurs souches de *E. coli* sont responsables de syndromes diarrhéiques (souches entéropathogènes ECEP, entéroinvasives ECEI, entérotoxinogènes ECET et entérohémorragiques ECEH) [29].

1.4.5- Isolement et culture

L'isolement de la bactérie peut être réalisé sur un milieu ordinaire (gélose nutritive) lorsque le prélèvement pathologique est monomicrobien. Dans le cas contraire, on utilise des milieux sélectifs électifs (EMB).

- En bouillon nutritif, *Escherichia coli* se développe en 24h en donnant un trouble du milieu sur toute la hauteur du tube. On observe également des ondes moirées quand on agite le bouillon.
- Sur gélose ordinaire, *Escherichia coli* se développe en donnant des colonies normales de type S qui sont rondes, bombées, lisses et des colonies de type R qui sont rugueuses, sèches, à surface et à bords irréguliers.
- Sur EMB, nous avons des colonies mordorées à reflet métallique présentant le classique aspect en dos de scarabée.

1.4.6- Caractères biochimiques

Pour l'identification de *E. coli*, on utilise la galerie API 20E ou la galerie de Leminor. *Escherichia coli* exprime les caractères généraux des entérobactéries figurant dans le tableau II ci-dessous.

Tableau II : Caractères biochimiques de *E. coli* [25]

Paramètre	Glucose	Lactose	ONPG	VP	Citrate	Mobilité	Urée	TDA	Gaz	H ₂ S	Indole
Réaction	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+

+ : réaction positive

- : réaction négative

1.5- BETA-LACTAMINES

Les β -lactamines constituent la famille la plus diversifiée et la plus importante parmi les antibiotiques. Ces antibiotiques sont caractérisés par une activité bactéricide avec un spectre d'activité variable centré sur les cocci Gram positif et les bacilles Gram négatif. Ils ont une très faible toxicité, mais un pouvoir allergène assez marqué.

1.5.1- Structure chimique et composition des β -lactamines

Sur le plan structural, les β -lactamines sont caractérisées par la présence d'une fonction amide cyclisée (cycle β -lactame), qui est responsable de l'activité antibactérienne. Selon la nature de l'hétérocycle associé au cycle β -lactame, on distingue :

- le groupe des pénicillines (noyaux pénème, clavame, carbapénème) ;
- le groupe des céphalosporines (noyaux céphème, céphamycine, oxacéphème) ;
- le groupe des monobactames (noyau azétidine).

1.5.1.1- Pénicillines

La structure des pénèmes comporte un cycle thiazolidine associé au cycle β -lactame (Figure 1).

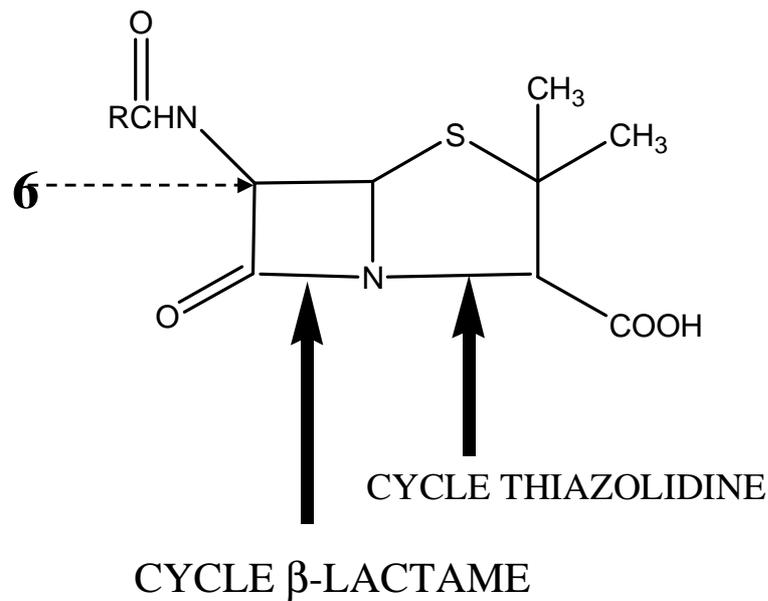


Figure 1 : Structure des pénames [28]

La nature du radical chimique greffé en position 6 sur le squelette de base détermine les propriétés particulières des différentes molécules de cette famille.

Le groupe des pénicillines est composé de :

- Pénicilline G et dérivés : benzylpénicilline, phénoxyéthyl-pénicilline ;
- Pénicilline M : méticilline, oxacilline et dérivés ;
- Aminopénicillines : ampicilline, amoxicilline ;
- Carboxypénicillines : carbénicilline, ticarcilline ;
- Acyluréidopénicillines : mézlocilline, azlocilline, afalcilline, pipéracilline ;
- Méthoxycarboxypénicillines : témocilline ;
- Amidinopénicillines : pivmécillinam ;
- Inhibiteurs enzymatiques : acide clavulanique, sulbactam, tazobactam ;
- Carbapénèmes : imipenem.

1.5.1.2- Céphalosporines

Le groupe des céphalosporines est constitué principalement par les céphèmes, molécules qui se distinguent des pénèmes par la présence d'un cycle dihydrothiazine (Figure 2)

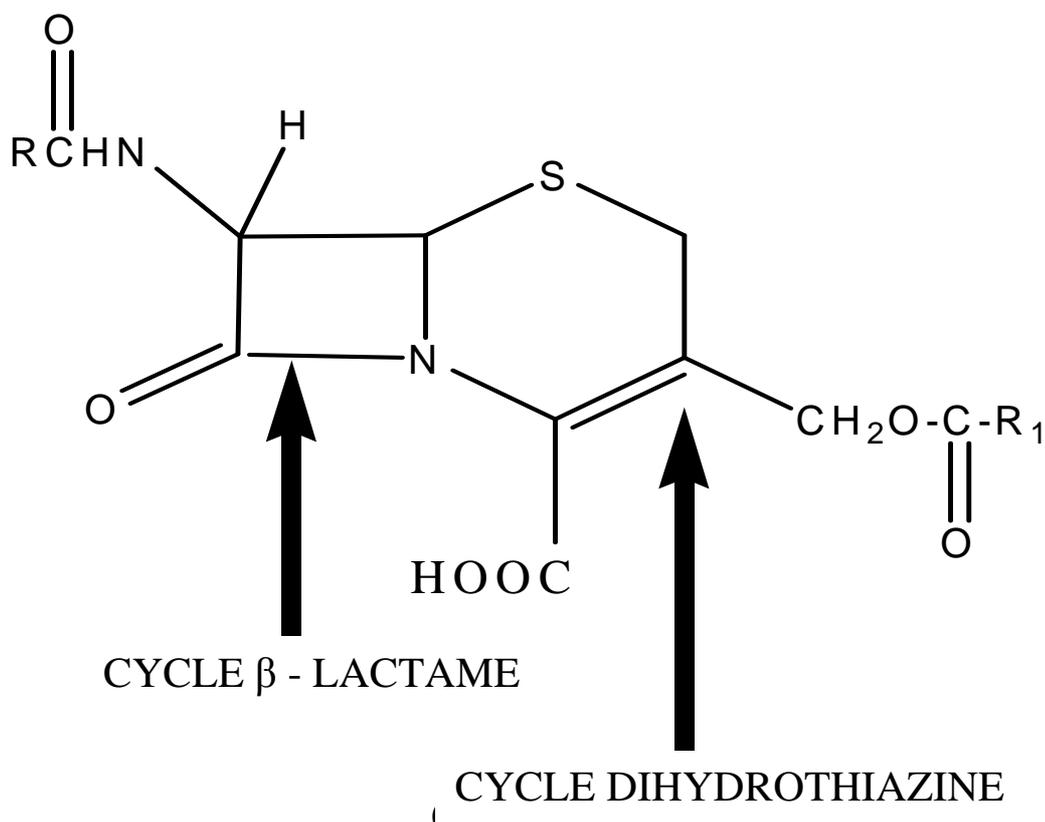


Figure 2 : Structure des céphèmes [28]

Ce groupe est constitué des céphalosporines de:

- ✓ Première génération (noyau céphème) : céfalotine, céfazoline, céfalexine etc..
- ✓ deuxième génération: noyau céphème (céfamandole, céfuroxine) et noyau céphamycine (céfoxitine, céfotétan)

- ✓ Troisième génération: noyau céphème plus aminothiazole (céfotaxime , ceftazidime, ceftriaxone)

Noyau oxacéphème : latamoxef [28]

On distingue aussi le groupe des monobactames à noyau azétidine : aztréonam. Ce dernier possède une activité comparable à celle des céphalosporines de troisième génération en raison de sa bonne stabilité vis-à-vis des β -lactamases.

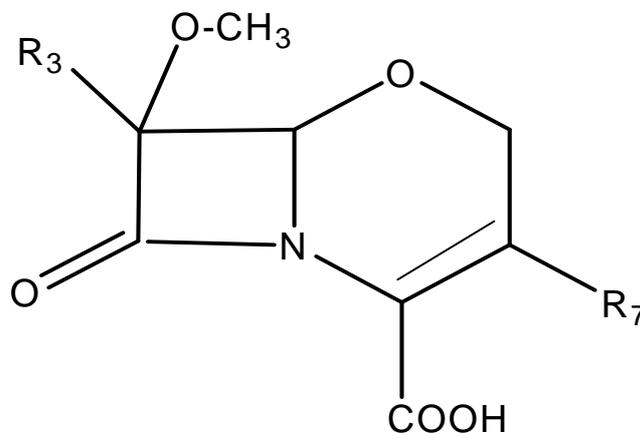


Figure 3 : Structure des monobactames [9]

Remarque :

Les β -lactamines sont des acides faibles à groupement acide carboxylique COOH. Ce groupement acide permet la préparation des sels et esters utilisés en thérapeutique.

Exemple : Benzyl - pénicillinate de sodium

1.5.2. Mécanisme d'action des β -lactamines

Les β -lactamines sont des antibiotiques qui inhibent la synthèse de la paroi bactérienne. Les transpeptidases et les carboxypeptidases, enzymes associées à la membrane cytoplasmique, fixent de façon covalente ces antibiotiques. Cette liaison

est due à une analogie structurale entre le substrat de ces enzymes, l'acyl- D-alanyl- D-alanine et le cycle β -lactame. Ces enzymes qui lient les pénicillines et les céphalosporines sont également dénommées Protéines de Liaison aux Pénicillines (PLP). Les PLP présentent une spécificité d'espèces et leur nombre varie d'une espèce bactérienne à une autre.

Chacune a une fonction bien définie mais plusieurs d'entre elles jouent un rôle prépondérant dans la synthèse du peptidoglycane à partir du substrat naturel. L'inhibition de ces enzymes est donc à l'origine de l'inhibition de la synthèse du peptidoglycane.

Chez les bacilles à gram positif, les β -lactamines atteignent facilement leur cible, car la diffusion de ces molécules à travers le peptidoglycane se fait passivement.

En revanche chez les bacilles à gram négatif (BGN) ces antibiotiques doivent, avant de diffuser dans le peptidoglycane, franchir la membrane externe hydrophobe. Composés généralement hydrophiles, le passage des β -lactamines à travers cette barrière se fait par l'intermédiaire de véritables canaux protéiques : les porines. [31]

1.6- RESISTANCE DES BGN AUX ANTIBIOTIQUES : [25]

D'un point de vue bactériologique, une souche est dite résistante lorsqu'elle peut croître en présence d'une concentration d'antibiotique plus élevée que celle qui inhibe la majorité des souches de la même espèce.

Ainsi, les BGN se défendent contre l'action des antibiotiques :

- en produisant des enzymes capables de les inactiver
- en se rendant imperméables à leur pénétration
- en modifiant la structure de leurs cibles (modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique).

1.6.1- Les enzymes inactivant les antibiotiques

Ces enzymes produites par les bactéries inactivent l'antibiotique en le modifiant ou en l'hydrolysant. [25]

1.6.1.1- Les enzymes inactivant les β -lactamines : les β -lactamases

Parmi les trois groupes d'enzymes impliquées dans l'hydrolyse des β -lactamines (acylases, estérases et β -lactamases), seules les β -lactamases présentent véritablement un intérêt en bactériologie médicale [20;10]. Les β -lactamases sont des enzymes d'inactivation de type sérine (classe A, C et D) ou Métalloenzyme (classe B) dont les substrats sont les β -lactamines [49].

Selon l'affinité de l'enzyme pour son substrat, on distingue :

- Les Pénicillinases : qui ont pour substrat préférentiel les pénicillines.
- Les céphalosporinases: qui hydrolysent principalement les céphalosporines.
- Les β -lactamases à spectre élargi (BLSE) : capables d'inactiver l'immense majorité des β -lactamines y compris les céphalosporines de 3^{ème} génération.

a- Les pénicillinases

Les pénicillinases des BGN sont nombreuses. Elles peuvent être d'origine chromosomique ou plasmidique. Plus de 17 pénicillinases ont été identifiées [18; 15]. Parmi elles on distingue :

✓ *Pénicillinases chromosomiques*

Elles sont spécifiques de l'espèce et confèrent à la bactérie une résistance naturelle. C'est ce qui est observé chez *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Levinae malonatica* et *Levinae amalonatica*. La sensibilité est restaurée par des associations β -lactamine-inhibiteurs de β -lactamases (Exemple : Amoxicilline + Acide clavulanique).

✓ *Pénicillinases plasmidiques*

Elles confèrent à la bactérie une résistance acquise. Parmi elles, on distingue :

► **Les pénicillinases de type (TEM)**

Elles sont d'origine plasmidique et rendent les souches qui en produisent (principalement les entérobactéries) résistantes aux Pénicillines G, A et aux carbénicillines ; mais si le niveau de production est élevé, la résistance s'étend aux acyluréido-pénicillines, aux céphalosporines de 1^{ère} et seconde génération (C₁G, C₂G) et à quelques céphalosporines de 3^{ème} génération (C₃G). [24]

Certaines de ces pénicillinases résistent aux inhibiteurs (Acide clavulanique, Sulbactam...) qui sont alors totalement inefficaces : on les appelle IRT (Inhibitor Resistant TEM) et les souches d'entérobactéries productrices sont résistantes aux Pénicillines A et aux Carboxypénicillines même lorsqu'elles sont associées à des inhibiteurs. [24]

b- Les céphalosporinases

Les céphalosporinases sont des β -lactamases chromosomiques produites naturellement à bas niveau par un certain nombre de bacilles à Gram négatif [15].

c- Les β -lactamases à spectre élargi

Les β -lactamases à spectre élargi sont définies comme des β -lactamases capables d'hydrolyser les oxy-imino-céphalosporines et sont inhibées par l'Acide clavulanique [15]. Les souches productrices de BLSE sont résistantes aux β -lactamines y compris certaines C₃G et monobactames (Aztréonam).

✓ **Caractères biochimiques**

Les BLSE apparaissent par suite d'une mutation génétique qui les rend capables d'hydrolyser les β -lactamines à large spectre. Elles conservent cependant leur pouvoir catalytique sur les pénicillines, mais les modifications subies par leur site actif peuvent entraîner une augmentation de la sensibilité aux inhibiteurs. Les BLSE sont inactives sur les céphamycines (céfoxitine, céfotétan). Cependant, certaines souches peuvent devenir résistantes par perte d'une protéine de porine de la membrane externe. Les BLSE ont un pHi compris entre 5,2 et 8,6 [18].

✓ **Différents phénotypes de BLSE**

La plupart des BLSE rencontrées sont de type TEM ou SHV. Ce sont :

- **TEM**

Du nom du malade chez qui on a isolé la 1^{ère} souche porteuse de ce type d'enzyme (TEM1-20) [24].

TEM-3, première enzyme de ce type ayant montré le phénotype BLSE, a été décrite en 1989. Depuis, plusieurs dizaines de β -lactamases de type TEM ont été identifiées. La plupart montrent un phénotype BLSE. Cependant, certaines d'entre elles sont en plus des IRT (Inhibitor Resistant TEM).

Il existe également deux types (TEM 50 et TEM 68) présentant à la fois un phénotype BLSE et IRT. Elles sont fréquemment isolées chez *E. coli*, *K. pneumoniae* mais aussi *Enterobacter aerogenes*, *Morganella morganii*, *Salmonella spp.* Les BLSE de type TEM ont un pHi compris entre 5,2 et 6,5 [15].

- **SHV**

Ce sont des enzymes rencontrées surtout chez *K. pneumoniae* et moins fréquemment chez *Citrobacter diversus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*. De nos jours, plus de 15 BLSE de type SHV ont été isolées. Seule SHV-10 présente à la fois les phénotypes BLSE et IRT [15].

- CTX-M

Elles hydrolysent préférentiellement la céfotaxime et sont principalement isolées chez *Salmonella Thyphimurium* et *E. coli*. Ces enzymes sont caractérisées par une rapidité d'hydrolyse du céfotaxime, et une meilleure sensibilité au tazobactam qu'au sulbactam et à l'Acide clavulanique [15].

- OXA

Les BLSE de type OXA confèrent une résistance à l'ampicilline et à la céfalotine et sont caractérisées par une haute activité sur l'oxacilline et la cloxacilline. Elles sont faiblement inhibées par l'acide clavulanique. Elles sont fréquemment isolées chez *Pseudomonas aeruginosa* et présentent une résistance de haut niveau à la ceftazidime. Cependant, le phénotype OXA-17 confère quant à elle une résistance à la ceftriaxone et au céfotaxime [15].

- PSE

Les PSE sont des BLSE produites principalement par les *Pseudomonas*. De plus, les PSE₁ et PSE₄ sont maintenant appelées respectivement CARB₂ et CARB₁ à cause de leur action préférentielle sur les carboxypénicillines [25].

d- Localisation sub-cellulaire et mécanisme d'action des β -lactamases

Les β -lactamases ont une localisation périplasmique : elles se retrouvent entre la membrane externe hydrophobe et la membrane interne [50]. Les β -lactamases hydrolysent les molécules de β -lactamines en attaquant le cycle β -lactame. Elles entraînent en effet l'ouverture du cycle avec comme conséquence la formation d'un groupement carboxyle libre COO⁻. On obtient alors pour les pénicillines l'acide pénicilloïque et pour les céphalosporines, l'acide céphalosporoïque (Figure 4).

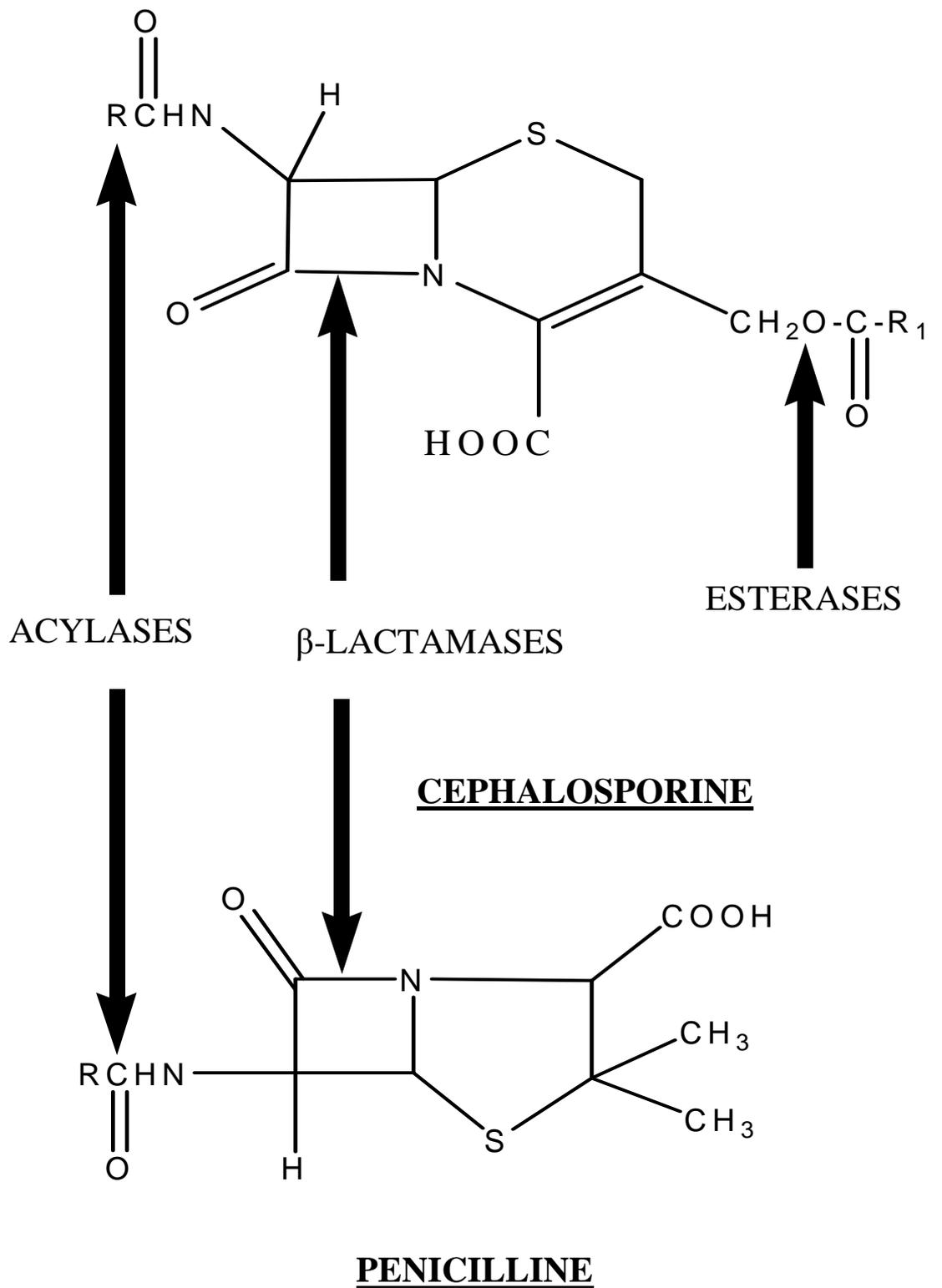


Figure 4 : Sites d'attaques des enzymes hydrolytiques sur les molécules de β-lactamines [20]

1.6.1.2- Les enzymes inactivant les aminosides

Les enzymes constitutives et plasmidiques qui hydrolysent les aminosides sont :

- Les aminosides phosphotransférases (APH)
- Les aminosides nucléotidyltransférases (ANT)
- Les aminosides acétyltransférases (AAC)

En étudiant le comportement des souches en présence de différents aminosides grâce à un antibiogramme [Gentamicine (G), Tobramicine (T), Nétilmicine (N) et Amikacine(A)], on peut définir les phénotypes suivants : G, GT, GTN, TNA et GTNA. Les phénotypes résistants sont rares ; moins de 3% chez *Escherichia coli*, *Salmonella* et *Shigella* et un peu moins rares chez *Proteus* mais deviennent plus fréquents, atteignant 20 à 50%, chez les autres entérobactéries : *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia* [24; 25].

1.6.1.3- Les enzymes inactivant les phénicolés

Une chloramphénicol-acétyl-transférase (CAT) est responsable d'une résistance plasmidique, décelable chez les entérobactéries en particulier chez *Salmonella Typhimurium* ainsi que les espèces appartenant au genre *Staphylococcus*, *Neisseria*, *Pseudomonas* [24; 25].

1.6.2- Autres mécanismes

➤ Résistance par diminution de la perméabilité

Elle est due à des mutations entraînant des modifications quantitatives ou qualitatives des porines, qui sont responsables de résistances acquises souvent croisées à plusieurs familles d'antibiotiques. Elles sont constatées chez les entérobactéries (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae*,

Salmonella, *Serratia*), chez *Pseudomonas* et *Neisseria gonorrhoeae*, mais n'occasionnent pas toujours de résistances perçues cliniquement [25].

➤ ***Résistance par modification de la cible***

Cette résistance est due à la diminution d'affinité des PLP (Protéines de liaison aux pénicillines), soit par augmentation de leur production, soit par synthèse de nouvelles PLP de très faible affinité. Observée surtout avec les bactéries à Gram positif, la résistance acquise par modification de la cible est due à une mutation de gènes chromosomiques ou à l'acquisition de nouveaux gènes par transfert génétique [11; 26] (Tableau III).

Tableau III : Mécanismes de résistance des BGN aux antibiotiques [26]

	MECANISME	GERME	SUPPORT
B-lactamines	β -lactamases	Bacilles à Gram négatif	Plasmidique ou chromosomique
	Modification des PLP	Pseudomonas	
Aminosides	Imperméabilité	Pseudomonas	Mutation
	Enzymes APH, ANT, AAC	Bacilles à Gram -	Plasmidique
Quinolones	Modification gyrase Imperméabilité	Bacilles à Gram -	Mutation
Tétracyclines	Elimination Imperméabilité	-	Plasmidique Mutation
Phénicoles	Inactivation enzymatique	BGN	Plasmidique
Polypeptides	Imperméabilité	Bacilles à Gram -	Mutation
Rifampicines	Transcriptase modifiée	-	Mutation

APH : Aminoside-phosphotransférase

ANT : Aminoside-Nucléotidyltransférase

AAC : Aminoside-Acétyletransférase

Remarque :

Au regard du dynamisme qui caractérise l'évolution de la résistance des bactéries aux antibiotiques, il est nécessaire de préciser que les phénotypes de résistance tels qu'ils ont été décrits plus haut sont susceptibles d'avoir connu des modifications depuis l'ores.

1.7- METHODES DE DETECTION DES β -LACTAMASES AU LABORATOIRE

Les méthodes de détection rapide des β -lactamases se fondent sur l'ouverture du cycle β -lactame, s'accompagnant de la formation d'acide pénicilloïque pour les pénicillines et d'acide céphalosporoïque pour les céphalosporines. Il s'agit principalement des méthodes spectrophotométriques et microbiologiques.

1.7.1- Méthodes spectrophotométriques

Il s'agit :

- ❖ Des méthodes acidimétriques basées sur la modification du pH à la suite de la formation de l'acide céphalosporoïque ou pénicilloïque ;
- ❖ De la modification électronique de la molécule s'accompagnant d'une absorption de lumière (méthode chromogénique) ;
- ❖ De la méthode iodométrique basée sur la réduction de l'iode (ou déplacement de l'amidon) qui entraîne une décoloration ;
- ❖ De la méthode spectrophotométrique directe en UV.

La densité optique de la solution enzymatique est lue à environ 260 ou 280 nm

1.7.2- Méthodes microbiologiques

Elles reposent sur l'inactivation de l'antibiotique.

▲ *Technique en milieu liquide*

La mise en évidence de la β -lactamase en milieu liquide s'effectue par la méthode NCCLS [43] en suivant les recommandations de Jarlier et coll. [33]. La suspension bactérienne est ajoutée au bouillon MH contenant des C₃G à 1 μ g/mL

(ceftazidime, cefotaxime, ceftriaxone, aztréonam). Après une incubation à 37°C pendant 18 heures, les bouillons présentant un trouble sont déclarés positifs.

Les CMI de la ceftazidime, ceftazidime-acide clavulanique, la céfotaxime, céfotaxime-acide clavulanique sont déterminées pour chaque souche correspondant à un bouillon positif.

Les CMI de la ceftazidime et de la ceftazidime-Acide clavulanique sont ensuite comparées. Les souches qui induisent un rapport CMI ceftazidime sur CMI ceftazidime-acide clavulanique supérieur ou égal à 8 sont déclarées productrices de BLSE.

▲ *Technique de diffusion sur milieu gélosé*

Pour les milieux gélosés, la technique de diffusion ou technique des doubles-disques permet de comparer les diamètres des zones d'inhibition pour l'amoxicilline et l'association amoxicilline -acide clavulanique afin de mettre en évidence une synergie (bouchon de champagne) [16].

La mise en évidence de β -lactamases peut être effectuée également par la méthode automatique du système Vitek, ou celle dite E-test, ou encore par la cefoxitine. Il existe par ailleurs d'autres méthodes telles que la détermination du point isoélectrique par électrofocalisation, la mesure de la quantité de CO₂ obtenu par décarboxylation de l'acide formé (méthode manométrique) et les méthodes de détection de la biologie moléculaire.

1.8- METHODES COURANTES D'EXTRACTION ET DE PURIFICATION DES ENZYMES

Les méthodes d'extraction et de purification des enzymes sont celles utilisées généralement pour les protéines.

1.8.1- Extraction des protéines [47]

Le stade préliminaire à l'isolement d'une protéine est son extraction à partir d'un matériel biologique. Après un broyage des tissus, la matière première est soumise à une extraction exhaustive, à plusieurs reprises dans une solution saline diluée ou parfois dans un tampon.

L'extraction des protéines intracellulaires est facilitée par des procédés qui dissocient les structures cellulaires (ultrasons, congélations et décongélations successives). De même, l'emploi des détergents (Triton X 100 par exemple) peut être indispensable pour extraire des composés protéiques liés aux membranes ou aux parois cellulaires.

1.8.2- Purification [47; 30]

On opère en général en deux temps, le premier réalisant l'élimination des substances non protéiques.

1.8.2.1- Isolement de l'ensemble des protéines

On opère le plus souvent par précipitation saline. Le sel le plus utilisé est le sulfate d'ammonium, à diverses concentrations, par exemple entre 40 et 80% de saturation.

1.8.2.2- Fractionnement proprement dit du mélange protéique

a - Méthodes chromatographiques sur colonne

Elles permettent d'absorber un mélange de composés sur un gel. Un solvant approprié servira à éluer séparément les constituants du mélange.

✓ *Chromatographie sur échangeurs d'ions*

Les échangeurs macromoléculaires dérivés de la cellulose ou du polyamide sont fréquemment employés. Aux résines synthétiques, on préfère des polysaccharides substitués et insolubles (cellulose, dextrane réticulé) tels que la diéthylamino-éthyl cellulose (DEAE-cellulose) échangeur d'anions, ou la carboxyméthyl-cellulose (CM cellulose) échangeur de cations. Après fixation du mélange sur un échangeur à pH convenable, des variations progressives du pH ou de la force ionique entraînent une élution différentielle des protéines en fonction de leur charge électrique.

✓ *Chromatographie d'exclusion-diffusion*

Le gel le plus utilisé ici est le dextrane qui permet suivant sa porosité, de ralentir le passage des petites molécules, alors que les grosses molécules ne sont pas retenues par les mailles de ce tamis moléculaire. Le volume de l'élution est donc fonction de sa taille moléculaire (PM).

✓ *Chromatographie d'affinité*

Cette technique est utilisable lorsque la protéine à isoler est douée d'une activité biologique due à la reconnaissance d'une autre molécule appelée ligand.

Le ligand est, en général, lié de façon covalente sur un support chromatographique insoluble (agarose par exemple). Lors du passage d'un mélange protéique sur ce support, la protéine qui reconnaît le ligand s'y fixe seule, de façon non covalente.

Après un lavage de la colonne qui élimine les protéines non fixées, l'élution est enfin réalisée soit par une variation du pH ou de la force ionique (tampons dits déformants), ou mieux par une substance susceptible de diminuer l'affinité de la protéine pour le ligand. La Concanavalline A et la lectine de Ricin sont des ligands.

✓ **Chromatofocalisation**

Le gel est un échangeur anionique qui sépare les molécules en fonction de leur pHi. Les molécules sont fixées. Le passage d'une solution d'ampholines (acides α -aminés chargés) induit un gradient de pH dans le milieu. Les protéines fixées sont éluées à leur pHi.

Il existe par ailleurs d'autres méthodes chromatographiques :

- la chromatographie hydrophobe, l'absorption sur gel d'hydroxylapatite ou de phosphate calcique.
- La chromatographie liquide de haute performance (HPLC), l'éluion par un substrat ou un effecteur.

b- Méthodes non chromatographiques

Ce sont essentiellement des méthodes électrophorétiques.

L'électrophorèse consiste à séparer les protéines dans un champ électrique en fonction de leurs charges électriques. Il s'agit de :

- L'électrophorèse continue
- L'électrophorèse sur papier
- L'électrophorèse sur esters de cellulose
- L'électrophorèse en gel d'agarose, d'amidon ou de polyacrylamide
- L'Immunoélectrophorèse
- L'isoélectrofocalisation : Elle s'effectue sur un gel de polyacrylamide contenant des ampholines (acides aliphatiques polyaminés et polycarboxyliques de pHi variant entre 2 et 11 et de PM <1000). Lors de l'application d'un champ électrostatique, les protéines focalisent dans la zone correspondant à leur pHi.

1.9- CARACTERISATION DES ENZYMES

1.9.1- Propriétés cinétiques

1.9.1.1- Détermination de l'activité catalytique d'une enzyme

L'activité catalytique d'une enzyme est exprimée par la vitesse de la réaction qu'elle catalyse dans les conditions expérimentales bien précises. Le résultat est rapporté à une expression de quantité de produit apparu ou de substrat disparu par unité de temps [54]. Dans les méthodes cinétiques, on suit constamment l'évolution de la réaction en fonction du temps. Les méthodes spectrophotométriques par absorption moléculaire sont donc plus fréquentes. Ces méthodes facilement automatisables, permettent de vérifier que la vitesse est constante pendant la mesure (réaction d'ordre zéro) [54].

Les conditions opératoires sont standardisées pour qu'on puisse mesurer la vitesse maximale :

- $[S] \geq 10 K_m$ pour tous les substrats
- Durée d'incubation brève
- pH voisin du pH optimum
- Température standardisée : 25°C, 30°C, 37°C

La température de 37°C s'adapte mieux à nos climats chauds.

Si le produit de la réaction n'est pas coloré, on couple la réaction principale étudiée avec une réaction indicatrice.

La transformation d'une variation d'absorbance par unité de temps $\Delta DO / \Delta t$ en activité enzymatique se fait par application de la loi de BEER-LAMBERT aboutissant à :

$$\Delta C / \text{min} = \Delta DO / \text{min} \times 1 / \epsilon l = V$$

V est la vitesse de la réaction qui est la quantité de produit formé ou de substrat transformé en moles par litre ou en micromole par litre (de milieu réactionnel) par minute par l'action catalytique de l'enzyme contenue dans V_e mL d'échantillon dilué dans le volume réactionnel V_R . Il s'agit d'une dilution V_e / V_R [14; 40].

Pour avoir l'activité enzymatique (AE) réelle, il faut multiplier le résultat par V_R/V_e . Donc :

$$AE = \Delta DO / \text{min} \times 1 / \text{él} \times V_R/V_e$$

V_R est le volume réactionnel

V_e est le volume en Millilitres de l'échantillon dilué

1.9.1.2- Vitesse Maximale (Vmax)

La vitesse maximale (V_{max}) est celle atteinte lorsque les sites actifs de l'enzyme sont saturés par le substrat [54]. La vitesse maximale est atteinte lorsque la concentration en substrat est très supérieure à K_m ; plus exactement $[S] \geq 10K_m$. Dans ce cas la vitesse devient indépendante de $[S]$ et elle est constante (réaction d'ordre zéro) [47 ; 40].

1.9.1.3- Constante de Michaelis Menten (Km)

K_m représente la dissociation du complexe enzyme- substrat. On l'appelle parfois « Constante de dissociation apparente ». Son inverse $1/ K_m$ représente l'affinité de l'enzyme pour son substrat S. K_m a la dimension d'une concentration en substrat ; c'est d'ailleurs la concentration pour laquelle la vitesse de la réaction est égale à la moitié de la vitesse maximale [54 ; 40].

$$V = V_{max} / 2$$

V_{max} et K_m peuvent être déterminées expérimentalement en faisant varier la concentration en substrat. La courbe $1/V$ en fonction de $1/S$ est une droite dont la pente est égale à K_m / V_{max} et qui coupe l'axe des abscisses en $-1/ K_m$ et l'axe des ordonnées en $1/V_{max}$.

1.9.2- Propriétés physico-chimiques

➤ *pH optimum*

La variation du pH modifie l'ionisation du substrat et les charges électriques des acides aminés au niveau du site actif.

L'étude de la vitesse d'une réaction enzymatique en fonction du pH montre qu'elle passe par un maximum pour une valeur du pH appelée pH optimum [40; 39].

➤ *Température optimale*

Une élévation de la température augmente le mouvement des molécules et augmente en conséquence la vitesse des réactions chimiques à condition de ne pas atteindre des valeurs de température qui dénaturent la protéine enzymatique.

La température optimale est la température à laquelle la vitesse de la réaction est la plus élevée [40 ; 21].

➤ *pH isoélectrique*

Le pH_i est le pH pour lequel, la protéine enzymatique présente autant de charges positives que négatives [39].

2-Cadre, Matériel et Méthodes

2.1. CADRE

Nous avons mené une étude expérimentale de Décembre 2006 à septembre 2007.

Cette étude comprend :

- des tests bactériologiques portant sur des souches de *Escherichia coli* :
- des tests biochimiques portant sur les β -lactamases extraites de ces souches.

Les manipulations se sont déroulées au laboratoire du Centre d'Information et de Recherche en Santé de la Reproduction (CIRSAR) situé au carré N° 775 Cadjèhoun II Cotonou.

- Des analyses phytochimiques effectuées au Laboratoire de Pharmacognosie et des Huiles Essentielles (LAPHE) sis dans l'enceinte de l'Institut des Sciences Biomédicales Appliquées (ISBA) Cotonou.

2.2. MATERIEL ET REACTIFS

2.2.1. Matériel biologique

- Souches de *E. coli*. Il s'agit de deux souches de *E. coli* isolées d'infections urinaires chez la femme gestante : une souche de *E. coli* productrice de BLSE et une souche de *E. coli* productrice de pénicillinase. La BLSE et la pénicillinase ont été extraites respectivement de ces souches.

La souche de référence *E. coli* ATCC 25922 a été utilisée comme contrôle pour l'antibiogramme classique en milieu gélosé et pour tester les propriétés inhibitrices des extraits de *Terminalia superba*.

- Extraits végétaux. Ils sont réalisés à partir d'organes (feuilles, racines, écorces) de *Terminalia superba* séchés et broyés.

L'authenticité de *Terminalia superba* a été certifiée par l'herbier national.
(numéro spécimen : AA6304 / HNB)

2.2.2 Réactifs

- Acétate de plomb à 10 % dans l'eau distillée
- Acétate de sodium
- Acétate d'éthyle
- Acide chlorhydrique concentré
- Acide chlorhydrique à 5 % dans l'eau distillée
- Acide chlorhydrique à 10 % dans l'eau distillée
- Acide acétique pur
- Acide picrique à 5 % dans l'eau distillée
- Acide sulfurique à 10 % dans l'eau distillée
- Alcool éthylique à 70 % dans l'eau distillée
- Alcool éthylique à 75 % dans l'eau distillée
- Alcool éthylique à 96 %
- Ammoniaque à 25 % dans l'eau distillée
- Ammoniaque à 50 % dans l'eau distillée
- Caféine à 12 g/l dans l'eau distillée
- Chloroforme
- Chlorure ferrique à 1 % dans l'eau distillée
- Chlorure ferrique à 10 % dans l'eau distillée
- Dichlorométhane
- Ether
- Ether chloroformique
- Ether éthylique
- Ether de pétrole

- Hydroxyde de sodium 1N
- Hydroxyde de sodium à 20 % dans l'eau distillée
- Hydroxyde de potassium à 7,5 % dans l'éthanol
- Mélange anhydride acétique-acide sulfurique
- Méthanol
- Poudre de magnésium
- Réactif de FEHLING
- Réactif de MAYER
- Réactif de DRAGENDORFF
- Réactif de STIASNY
- Réactif de SHINODA
- Solution alcoolique de métanitrobenzène à 1 %
- Solution alcoolique d'acide dinitrobenzoïque 2 %
- Solution aqueuse de phosphate disodique
- Sulfate sodique anhydre
- Toluène

2.3. METHODES

2. 3. 1. Criblage phytochimique [48]

Les tests de caractérisation sont réalisés avec la poudre obtenue après broyage des organes séchés.

2. 3. 1. 1. Mise en évidence des dérivés quinoniques : réaction de Borntrager

Sur 2 g de poudre d'organes, ajouter 2 mL de HCl à 5 % puis 20 mL de chloroforme. Mettre sous agitation pendant 24 h. Filtrer puis ajouter 5 mL d'ammoniaque à 50 % au filtrat.

Une réaction positive est indiquée par une coloration rose à rouge violacée.

2. 3. 1. 2. Mise en évidence des saponosides

- Verser 1 g de poudre dans 100 mL d'eau distillée et porter l'ensemble à ébullition modérée pendant 30 min. Filtrer puis réajuster le filtrat à 100 mL avec de l'eau distillée.

- Réaliser une gamme de 10 dilutions en série géométrique de raison 1/10 avec de l'eau distillée. Agiter énergiquement pendant 30 s et laisser reposer pendant 15 min.

Un résultat positif est signalé par la présence de mousse dont la hauteur est supérieure ou égale à 1 cm.

2.3. 1. 3. Mise en évidence des stéroïdes et triterpènes

Une teinture est obtenue par macération de 1 g de poudre dans 10 mL d'alcool éthylique à 70° pendant 1 h. A 10 mL de cette teinture, ajouter 10 mL d'eau distillée et 2 mL d'acétate de plomb à 10 %. Laisser reposer pendant 15 min. 2 mL de solution aqueuse de phosphate disodique à 10 % sont ajoutés au mélange filtré.

Après 15 min, le filtrat recueilli dans une ampoule à décanter est extrait à 3 reprises par 5 mL de chloroforme. La solution chloroformique ainsi obtenue est

séchée sur du sulfate sodique anhydre, répartie dans 3 tubes à essais et soumise à une évaporation dans un bain de sable. On obtient des résidus. Les réactions effectuées sur les 3 résidus obtenus se résument dans le Tableau IV.

Tableau IV : Réactions de mise en évidence des stéroïdes et triterpènes

Résidu Réaction	1 ^{er} tube	2 ^e tube	3 ^e tube
LIEBERMANN BURCHARD	III à V gouttes d'acide acétique + 3 mL de solution anhydride acétique- Acide sulfurique <u>Observation</u> : Coloration violette à bleue ou verte → Stéroïdes et Triterpènes	---	---
RAYMOND	---	II gouttes de solu – tion alcoolique de métnitrobenzène 1 % + II gouttes de NaOH 20 % <u>Observation</u> : Coloration bleue → Cardénolides	---
KEDDE	---	---	II gouttes de solu- tion alcoolique d'acide dinitroben- zoïque + II gouttes de NaOH 1 N <u>Observation</u> : coloration rouge pourpre → Cardénolides

2.3. 1. 4. Mise en évidence des composés réducteurs

50 ml d'eau distillée + 5 g de poudre

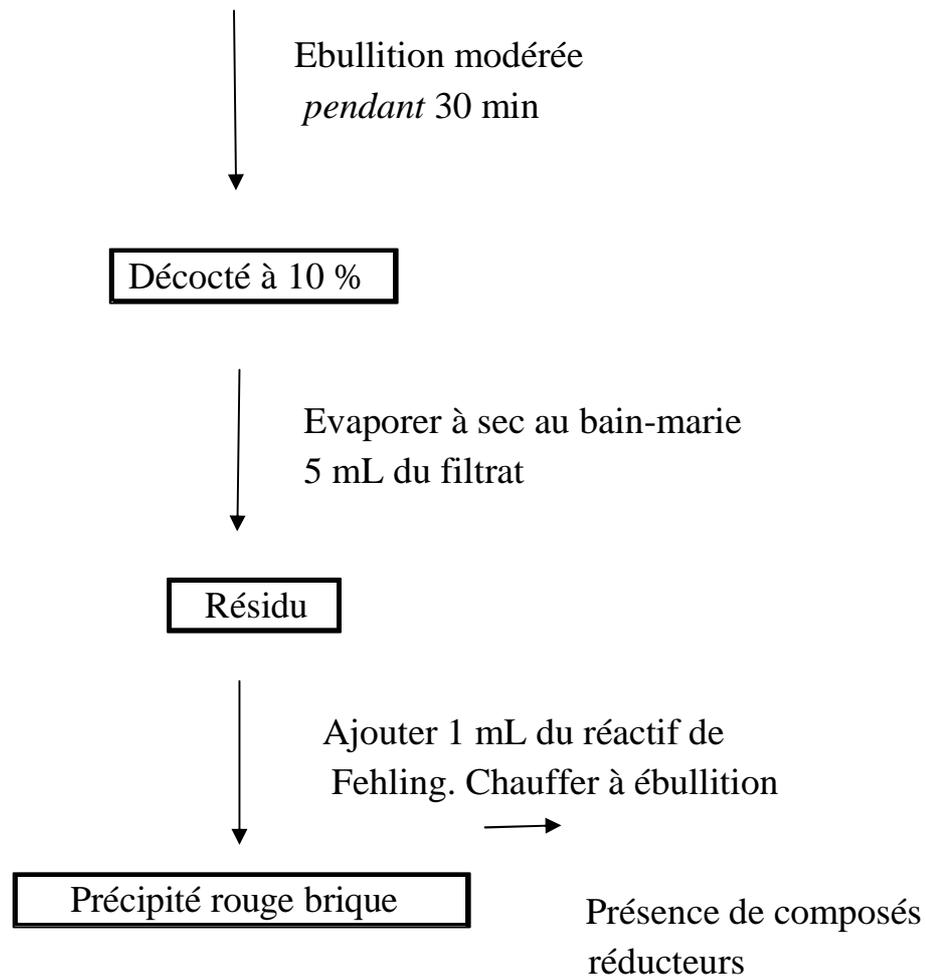


Figure 5 : Protocole de mise en évidence des composés réducteurs

2.3. 1. 5. Mise en évidence des mucilages

Un décocté à 10 % dans l'eau a été préparé comme précédemment. A 1 mL de ce décocté, ajouter 5 mL d'alcool absolu et mélanger.

L'obtention d'un précipité floconneux après 10 min indique la présence de mucilages.

2.3. 1. 6. Mise en évidence des composés polyphénoliques

Les composés polyphénoliques recherchés sont les tanins galliques et catéchiques, les flavonoïdes, les anthocyanes et leucoanthocyanes.

A 10 g de poudre, ajouter 100 mL d'eau bouillante. Après 15 min d'agitations continues, le mélange est filtré, réajusté à 100 mL puis divisé en deux portions :

De la première portion, on prend 10 mL pour la réaction de différenciation des tanins galliques et catéchiques. 5 mL serviront pour la détermination des flavonoïdes. 1 mL pour les anthocyanes et enfin 1 mL pour les leucoanthocyanes.

La deuxième portion servira à la réaction générale d'identification des tanins. Le protocole expérimental se résume dans le Tableau V.

Tableau V : Réactions de mise en évidence des composés polyphénoliques

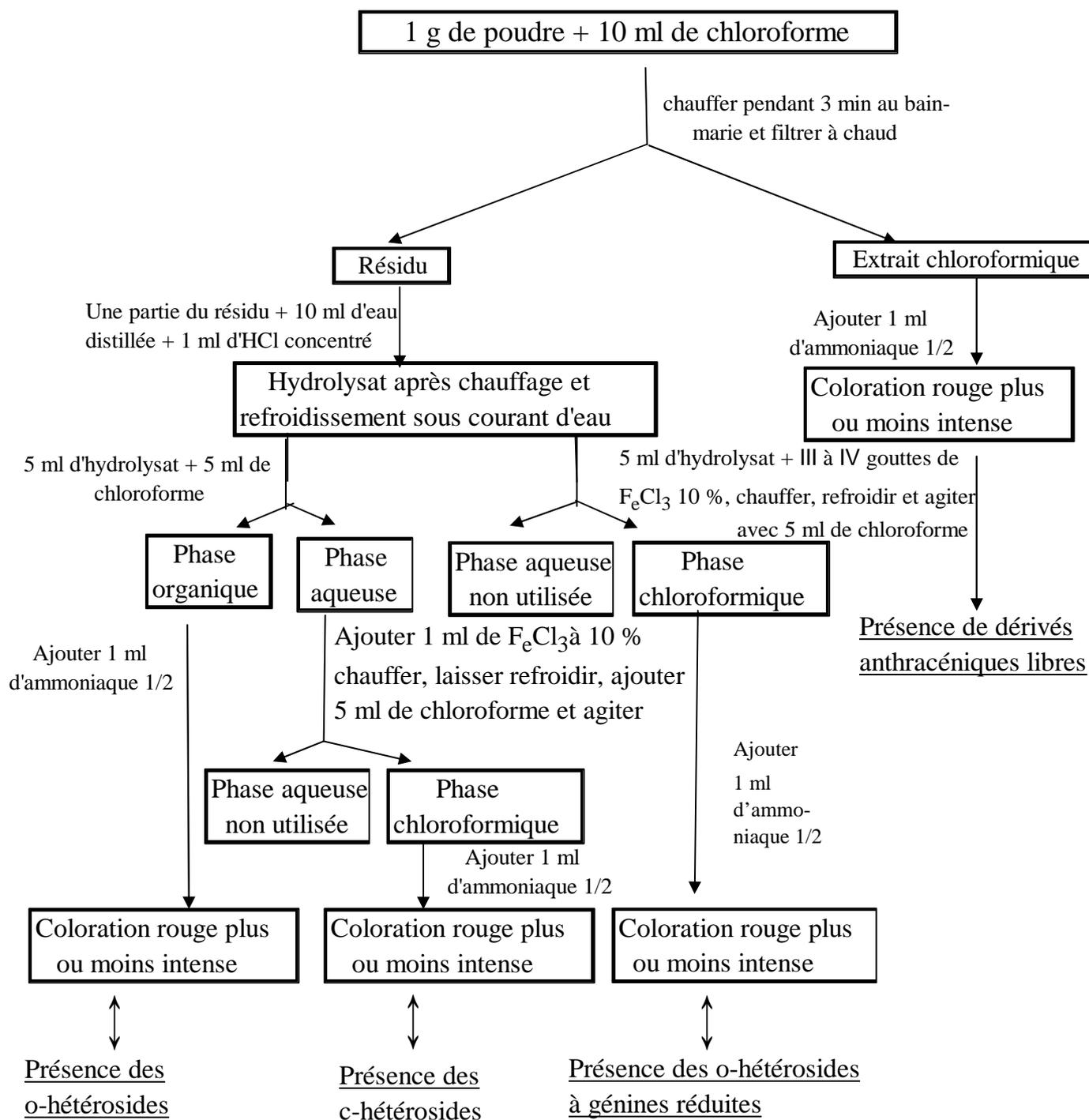
Infusé	50 MI	10 mL	10 mL	2 mL	1 mL	1 mL
Réactifs						
Chlorure ferrique 1 %	V gouttes	—	V gouttes	—	—	—
Réactif de STIASNY	—	5 mL	5 mL	—	—	—
Acétate de sodium	—	—	Jusqu'à saturation	—	—	—
Réactif de SHINODA	—	—	—	2 mL	—	—
Poudre de magnésium	—	—	—	Pincée	—	—
HCl à 5 %	—	—	—	—	V gouttes	—
Ammoniaque à 50 %	—	—	—	—	V gouttes	—
Alcool chlorhydrique	—	—	—	—	—	1 mL
OBSERVATION	<u>Présence de Tanins</u> : Coloration bleu foncé verte ou noire	<u>Présence de Tanins catéchiques</u> : Précipité rose après chauffage au bain-marie à 90° pendant 15 min	<u>Présence de Tanins galliques</u> : Coloration bleue ou noire	<u>Présence de Flavonoïdes</u> : Coloration orangée rouge ou violette	<u>Présence d'Anthocyanes</u> : Coloration rouge qui s'accentue et vire au bleu violacé ou verdâtre	<u>Présence de leucoanthocyanes</u> Coloration rouge cerise ou violacée après chauffage au bain-marie à 90° pendant 15 min

2.3.1.7. Mise en évidence des dérivés cyanogénétiques

15 mL d'eau distillée sont ajoutés à 2 g de poudre dans un erlenmeyer. Boucher immédiatement et laisser macérer pendant 1 h en agitant de temps en temps. Remplacer ensuite le bouchon par un papier imbibé d'acide picrique et chauffer environ 10 min.

L'apparition d'une coloration marron indique le dégagement d'acide cyanhydrique.

2.3. 1. 8. Mise en évidence des dérivés anthracéniques



Si la réaction n'est pas franchement positive, rechercher les o-hétérosides à génines réduites

Figure 6 : Protocole de mise en évidence des dérivés anthracéniques

2.3. 1. 9. Mise en évidence des coumarines

Introduire à de la poudre (1g) de l'éther (20mL) dans un flacon muni de bouchon et laisser macérer pendant 24 h. Le mélange est ensuite filtré et complété à 20 mL avec de l'éther. 5 mL de l'extrait étheré sont évaporés dans une capsule sous la hotte. Ajouter au résidu 2 mL d'eau chaude et 1 mL de NH_4OH à 25 % puis mélanger.

Observer sous UV à 366 nm. Une fluorescence intense indique la présence des coumarines.

2.3. 1. 10. Mise en évidence des alcaloïdes

- **Test de MAYER**

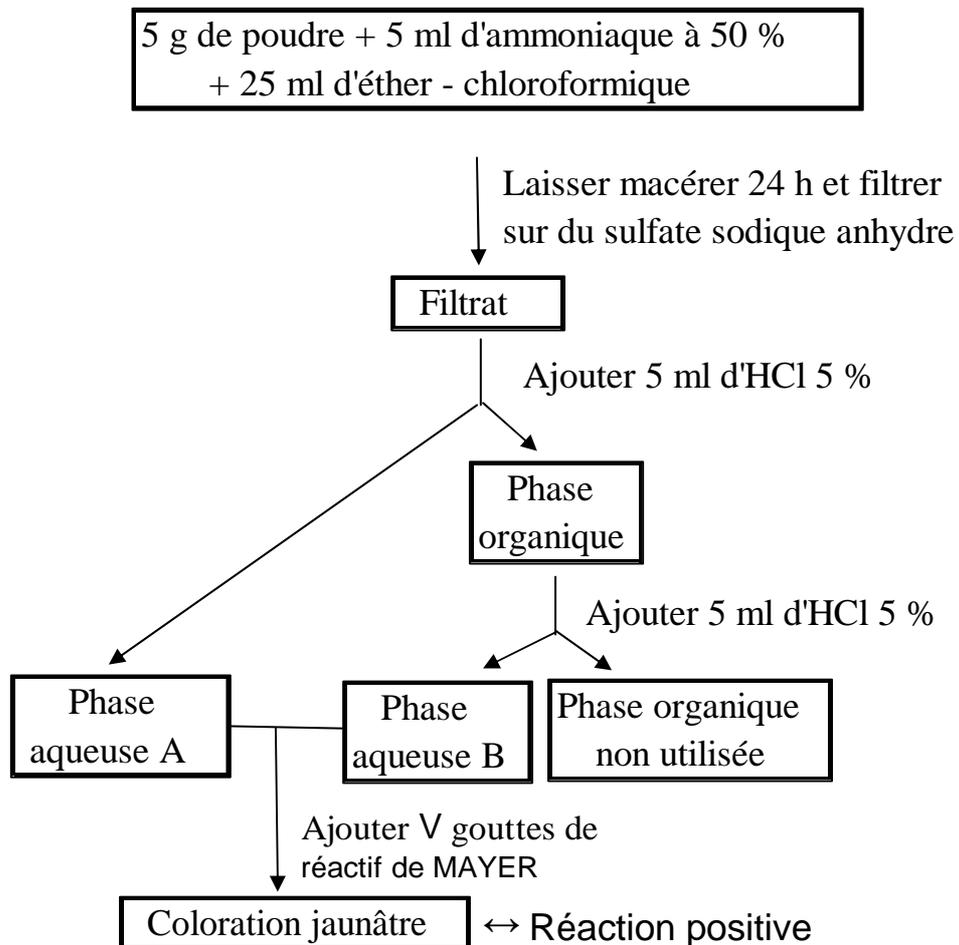
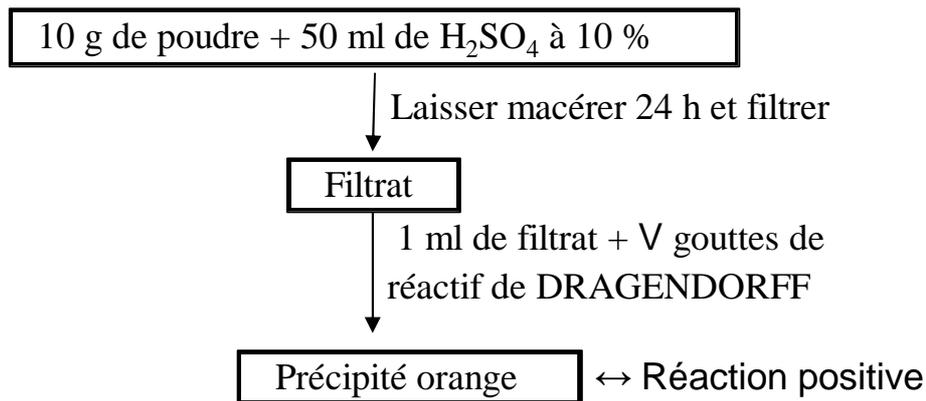


Figure 7 : Mise en évidence des alcaloïdes - test de MAYER

- **Test de DRAGENDORFF**



Dans le cas d'une réaction positive, il faut confirmer la présence d'alcaloïdes par une extraction

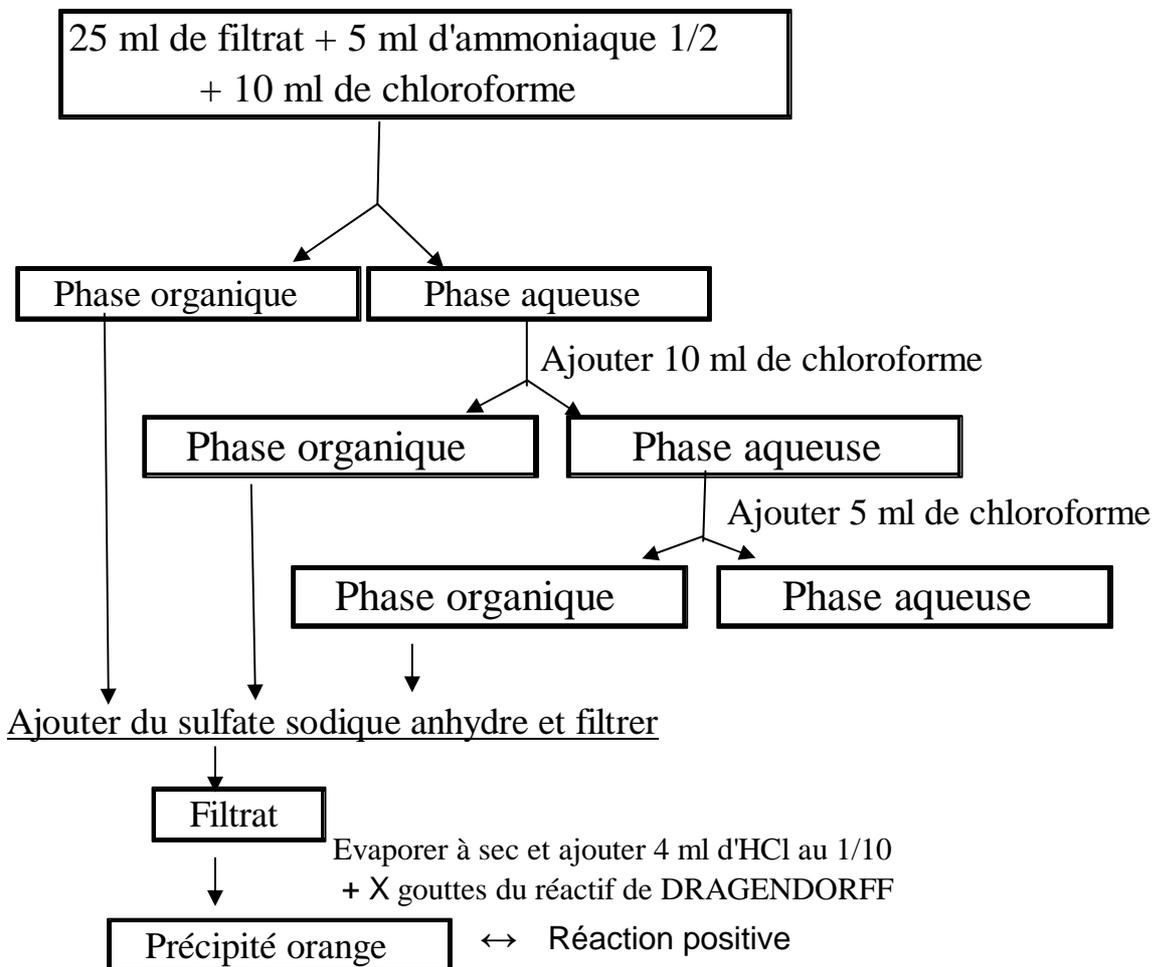


Figure 8 : Mise en évidence des alcaloïdes - test de DRAGENDORFF

2.3. 2. Analyse chromatographique sur couche mince (CCM) [57]

Afin de confirmer les résultats du screening phytochimique, nous avons utilisé une méthode d'analyse chromatographique sur couche mince. Cette méthode nous a permis de mettre en évidence certaines classes de composés du métabolisme secondaire dont les propriétés antibactériennes ont été signalées dans la littérature. Les analyses chromatographiques ont été effectuées pour l'identification des dérivés anthracéniques et les coumarines. Les témoins utilisés sont respectivement l'extrait de *Sene angustifolia folioles* et 2 H – chromen -2 – one.

2.3. 2. 1. Principe

La chromatographie est une méthode de séparation dans laquelle les constituants migrent dans une phase mobile ou éluant en fonction de leur affinité pour une phase stationnaire généralement polaire (Gel de silice 60F254).

Les plaques utilisées sont les plaques 20 x 20 60F254 de silicagel sur feuille d'aluminium MERCK®.

2.3. 2. 2. Préparation des échantillons

❖ Dérivés anthracéniques

- Extraits enrichis

0,5 g de chaque poudre (feuilles, écorces, racines) sont dilués dans 5 mL de méthanol à 50 %. La solution ainsi obtenue est chauffée pendant 5 min au Bain Marie puis filtrée.

- Extraits totaux éthanoliques

Une dilution de l'extrait éthanolique de chaque poudre est réalisée dans du méthanol à 50% à la concentration de 10 mg/mL.

- Témoin : solution commercialisée de *Sene angustifolia folioles*

❖ Coumarines

- Extraits enrichis

1g de chaque poudre est dilué dans 10 mL de méthanol pur. La solution est chauffée au Bain-Marie sous agitation pendant 30 min, filtrée puis évaporée jusqu'à 1 mL.

- Extraits éthanoliques

Une dilution de l'extrait éthanolique de chaque organe est réalisée dans du méthanol pur pour une concentration de 5 mg/mL.

- Témoin : une dissolution de 2 H-chromen-2-one a été réalisée dans du méthanol pur pour une concentration de 0,5 mg/mL.

2.3. 2. 3. Dépôt et migration des échantillons

On dépose respectivement :

- Pour les dérivés anthracéniques : 10 µL d'extraits totaux éthanoliques, 10 µL d'extraits enrichis et 20 µL de témoin anthracénique.

- Pour les coumarines : 10 µL d'extraits totaux éthanoliques, 5 µL d'extraits enrichis et 5 µL de témoin.

Ces échantillons ont été prélevés à l'aide de micropipettes de 10 µL (BLAUBRAND[®] intra MARK) et déposés en bandes de 10 mm espacées de 5 mm. Les premiers et derniers dépôts étaient à 15 mm de chaque bord.

Les plaques ont ensuite été séchées 10 min à l'air libre puis développés dans des cuves conventionnelles en verre (DESGA) remplies à environ 1 cm de hauteur avec une phase mobile selon le type de séparation recherchée. Les phases sont constituées de :

- acétate d'éthyle - méthanol - eau (100-17-13) pour les dérivés anthracéniques,

- toluène – éther (0,5 – 1) saturé à 10% d'acide acétique pour les coumarines.

Après migration des échantillons sur une hauteur de 80 mm, les plaques de CCM sont observées dans le visible et à l'UV (254 et 366 nm respectivement) puis finalement révélées avec de la potasse éthanolique à 7,5%.

2.3. 2. 4. Identification des substances

Elle se fait par la comparaison des facteurs de rétention. Les facteurs de rétention R_f sont calculés comme suit .

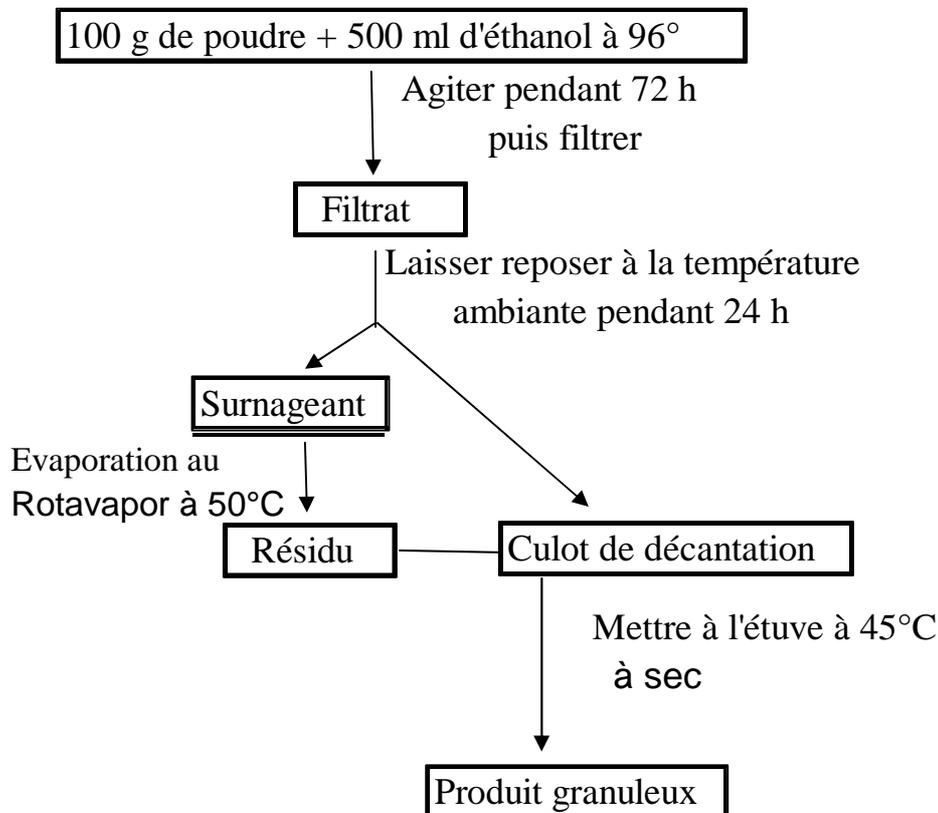
$$R_f = \frac{X_1}{X_0} \quad \text{avec}$$

X_1 : Distance de migration des constituants (comprise entre 0 et 8 cm)

X_0 : Distance de migration du solvant (égale à 8 cm)

2.3. 3. Extraits totaux

2.3. 3. 1. Extraits totaux éthanoliques



Le produit granuleux obtenu est pesé en vue de calculer le rendement. On réduit ensuite le résidu en fine poudre et on le conserve à -20°C .

Figure 9 : Protocole d'extraction éthanolique

2.3. 3. 2. Extraits totaux méthanoliques

Réaliser le protocole utilisé pour la préparation des extraits totaux éthanoliques avec 25 g de poudre pour 250 mL de méthanol.

2.3.3.3. Extraits totaux aqueux

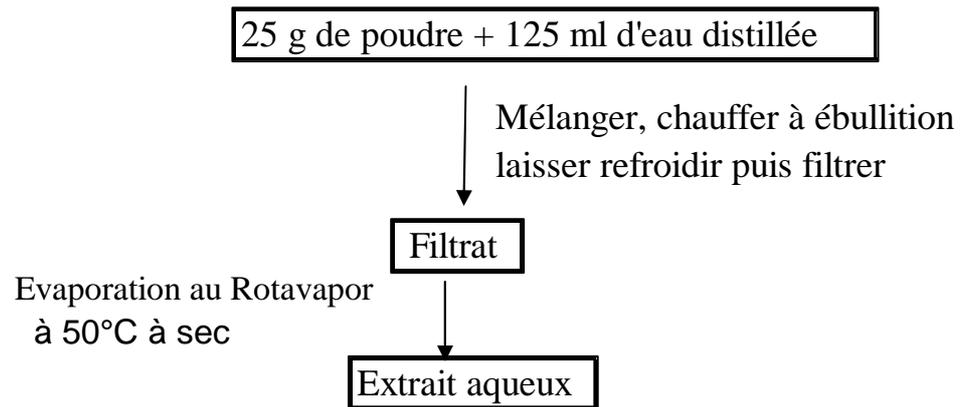


Figure 10 : Protocole d'extraction aqueuse

2.3. 4. Extractions par polarités croissantes de solvants

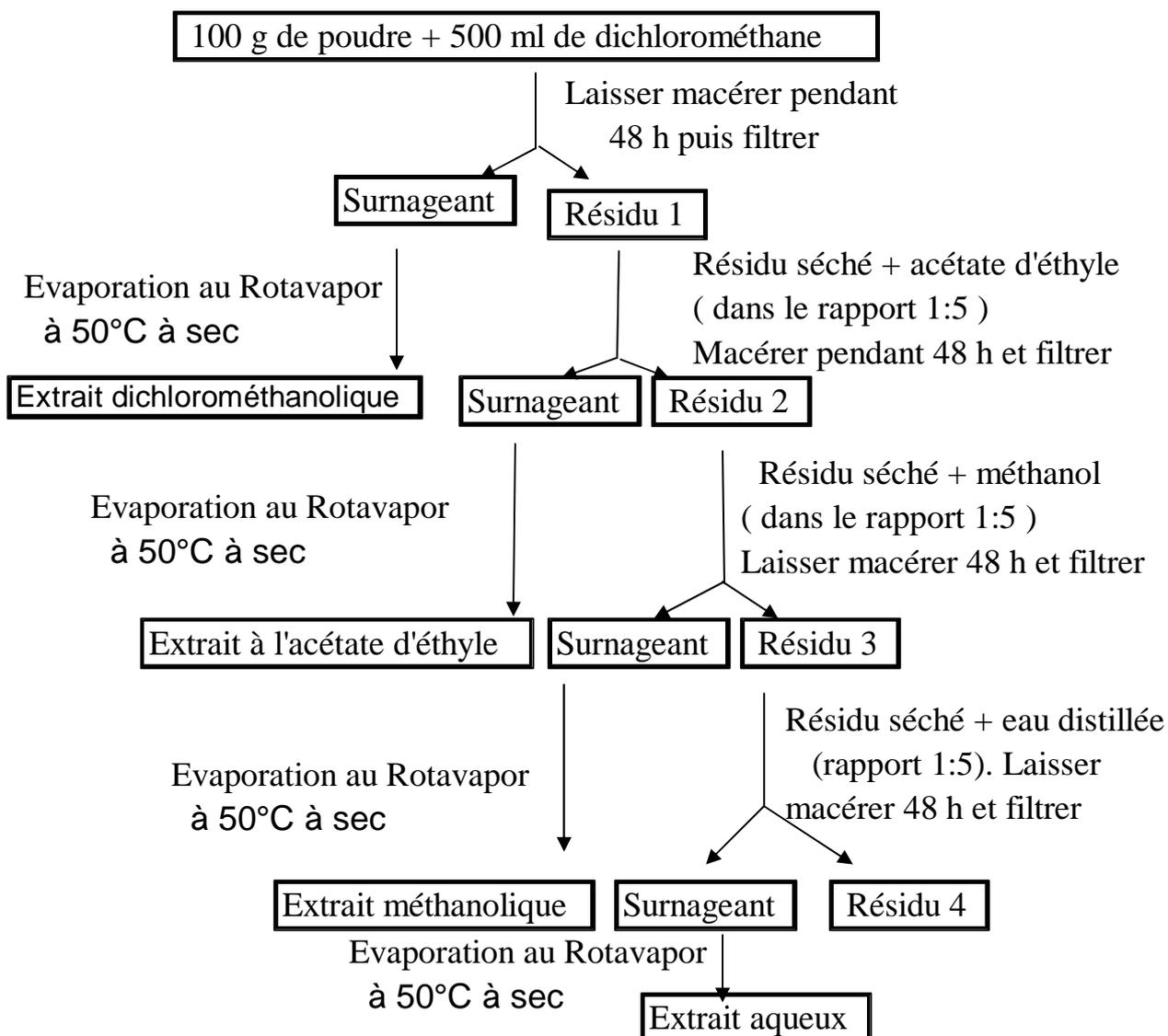


Figure 11 : protocole d'extraction par polarité par polarité croissante de solvant

2.3. 5. Extractions spécifiques

2.3. 5. 1. Extraction spécifique des dérivés anthracéniques [57]

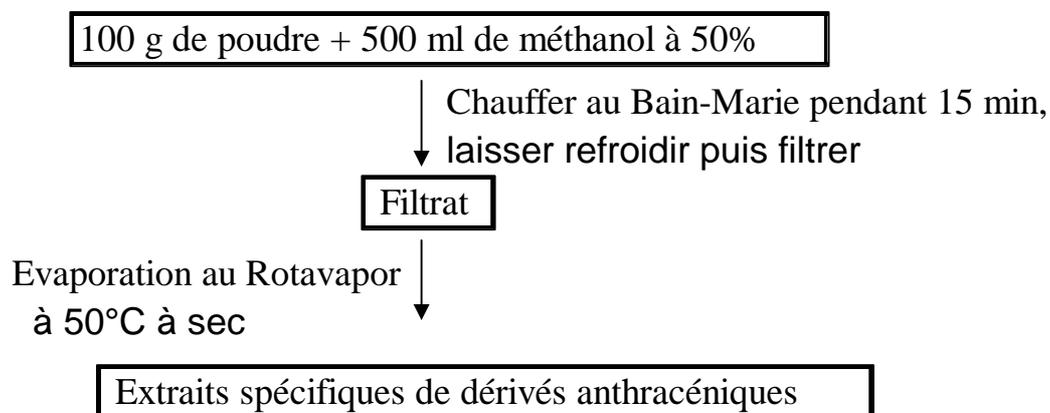


Figure 12 : Protocole d'extraction spécifique des dérivés anthracéniques

2.3. 5. 2. Extraction spécifique des coumarines [57]

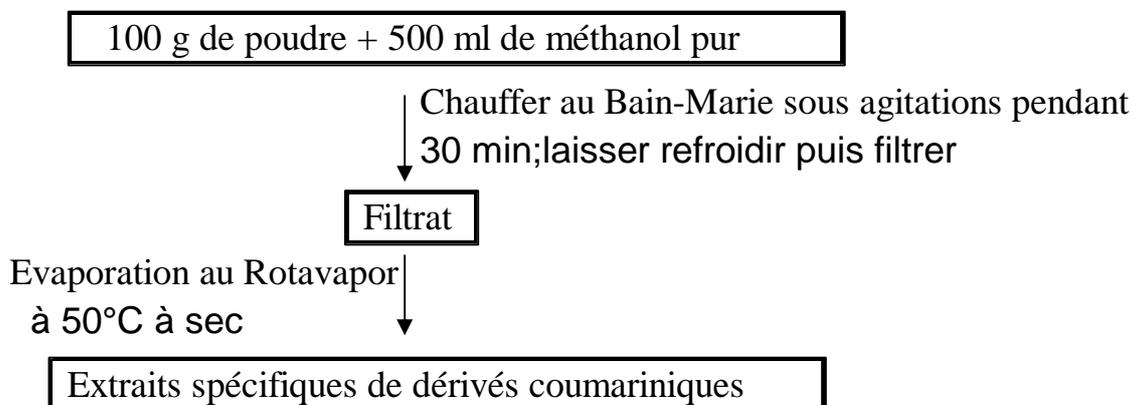


Figure 13 : Protocole d'extraction spécifique des coumarines

2.3. 5. 3. Extraction spécifique des tanins

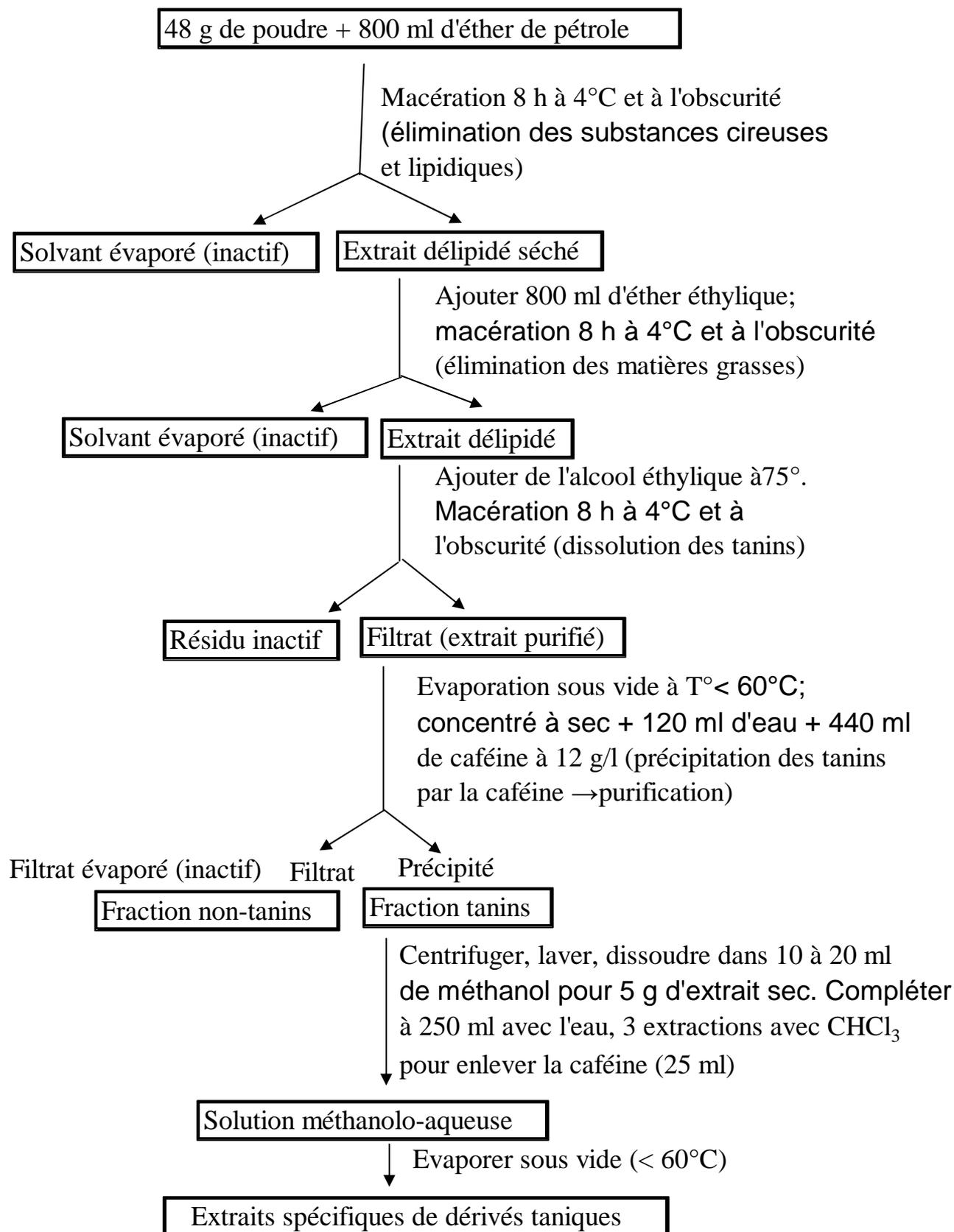


Figure14 : Protocole d'extraction spécifique des tanins

2.3. 5. 4. Extraction spécifique des mucilages [33]

10 g de poudre ont été dispersés dans 40 mL d'eau distillée à 95°C et homogénéisés 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 recueilli a été mélangé à de l'alcool isopropyle (1,5 parts de l'alcool pour 1 part du surnageant) pour obtenir un précipité mucilagineux. Le mucilage a été séché à 35°C pendant 48 h.

2.3.6- Etude bactériologique

2.3.6.1- Identification et conservation des souches de *E.coli*

➤ Identification des souches productrices de pénicillinase et de BLSE

Les souches de *E.coli* isolées des infections du tractus urinaire (ITU) sont préalablement identifiées par la galerie Api 20E.

Par ailleurs, la détermination des phénotypes de résistance de ces souches a été faite à l'issue d'un antibiogramme réalisé sur gélose MH. Les disques d'antibiotiques posés appartiennent aux familles :

- des **β-lactamines** (Amoxicilline, Amoxicilline + Acide clavulanique, Ceftriaxone, Céfotaxime, Céfazoline, Aztréonam, Imipénem)
- des **Aminosides** (Gentamicine, Netilmicine)
- des **Quinolones** (Ofloxacine, Ciprofloxaciline, Acide nalidixique)
- des **Cyclines** (Doxycycline)
- des **Phénicolés** (Chloramphénicol)
- des **Sulfamides** (Sulfaméthoxazol – triméthoprime)
- des **nitrofuranes** (nibiol)

- des **polypeptides** (Colistine)

Pour mettre en évidence la production de pénicillinase et de BLSE, on utilise la technique du « Bouchon de Champagne [34]. Lors de l'antibiogramme sur milieu MH, on pose un disque d'Amoxicilline +Acide clavulanique encadré par un disque d'Amoxicilline et un disque de Ceftriaxone à 1 cm de distance. La présence de pénicillinase ou de céphalosporinase produit une zone d'inhibition élargie (Bouchon de Champagne) soit respectivement du côté de l'Amoxicilline ou du côté de la Ceftriaxone. Une zone d'inhibition élargie simultanément des deux côtés révèle la production de BLSE.

➤ **Conservation des souches**

La conservation des souches s'inspire du protocole de COURVALLIN et coll. (1985) :

- Cultiver les souches de *E.coli* pendant 18 h sur gélose EMB, puis les repiquer sur gélose MH coulée en tube et en pente.

- Incuber à 37 °C pendant 18 h.

- Inonder la surface de la gélose avec 4 à 5 mL de Bouillon Trypticase Soja (BTS) contenant 15 % de glycérol (85 mL de BTS + 15 mL de Glycérol).

- Bien agiter, garder à 4 °C pendant 3 à 4 h puis congeler à -30 °C.

2.3.6.2- Détection de la β -lactamase en milieu liquide

La détection de la β -lactamase produite par *E.coli* a été faite en s'inspirant du test acidimétrique en tube de SYRE [55].

Après repiquage de la souche de *E.coli* productrice de pénicillinase ou de BLSE sur gélose EMB, on réalise des suspensions bactériennes dans du BTS stérile (10 petites colonies de chaque souche dans 1 mL de BTS).

L'incubation est réalisée à 37 °C pendant 18 h. Le protocole de détection est présenté dans le tableau VI.

Tableau VI : Détection de la β -lactamase par la méthode acidimétrique de SYRE.

	Témoin1	Témoin2	Echantillon
Eau distillée(ED)	300 μ L
BTS	...	300 μ L	...
Substrat-réactif	100 μ L	100 μ L	100 μ L
Suspension bactérienne	300 μ L

Ces suspensions sont incubées à 37 °C à l'étuve. On observe la réaction toutes les 15 minutes.

Lecture et interprétation

- **Réaction positive** : Virage de la couleur du mélange du rouge oranger au jaune
- **Réaction négative** : Pas de virage de la couleur du mélange

Les témoins doivent garder la couleur rouge oranger jusqu'à la fin de la lecture pour valider le test.

2. 3. 6. 3. Test d'inhibition de la croissance des souches de *E. coli* [20]

a. Préparation de la dilution de l'extrait total

L'extrait total est dissous dans l'eau distillée stérile à une concentration de 200 mg/mL (Solution mère ou SM).

Cette SM est stérilisée par filtration sur une membrane dont les pores ont un diamètre de 0,2 μm .

b. Réalisation de la suspension bactérienne

- Dans un petit tube à vis contenant 6 mL de BTS stérile, ensemencer une colonie moyenne (ou deux petites colonies) de *E. coli* (SB_1)
- A partir de cette suspension, réaliser deux dilutions successives (figure 15)

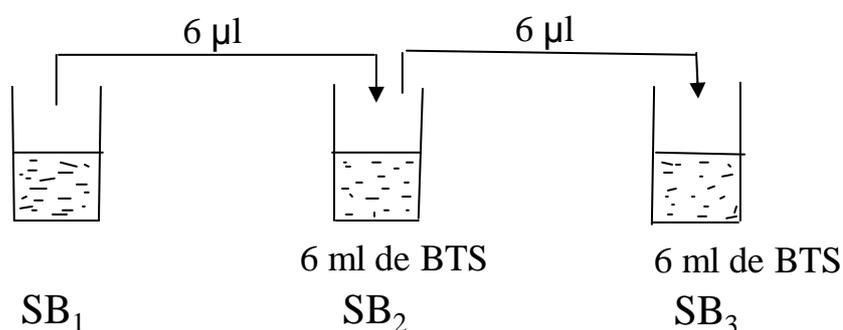


Figure 15 : Dilution de SB_1

- A 200 μL de SB_3 , ajouter 200 μL de la solution d'extrait de plante à 200 mg/mL.
- Réaliser un témoin en remplaçant l'extrait de plante par 200 μL d'eau distillée stérile.

T_1 = suspension bactérienne sans inhibiteur

I_1 = suspension bactérienne avec inhibiteur

- Incuber ces suspensions à 37 °C pendant 18 h et les soumettre à deux dilutions successives (figure 16)

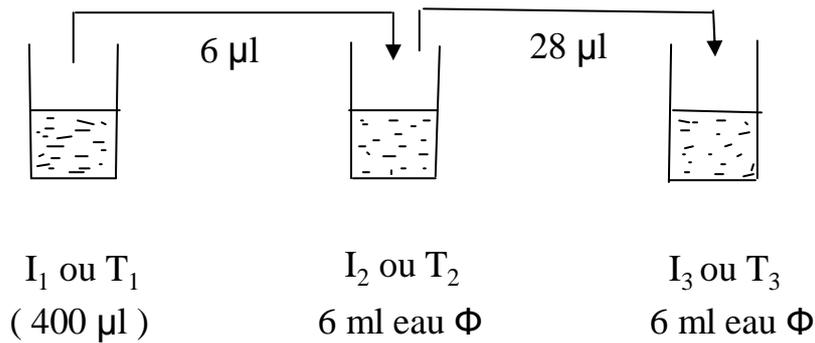


Figure 16 : Dilution de I_1 ou T_1

- Ensemencer 10 μ L de I_3 et T_3 en stries radiales sur gélose MH et incuber à 37 °C pendant 18 h.
- Procéder à la numération des colonies

Expression des résultats

$$\text{Pourcentage d'inhibition} = \frac{\text{Nombre de colonies de } I_3}{\text{Nombre de colonies de } T_3} \times 100$$

2.3. 6. 4. Concentration minimale inhibitrice (CMI) des extraits végétaux sur les souches de *E. coli* productrices de β -lactamases [20]

a. Préparation de la gamme de dilutions des extraits végétaux

L'extrait végétal est dissous dans l'eau distillée à une concentration de 100 mg/mL.

Cette SM est stérilisée par filtration sur une membrane dont les pores ont un diamètre de 0,2 μ m. La stérilité de cette solution est vérifiée par ensemencement sur gélose MH. Les dilutions suivantes sont réalisées dans l'eau distillée stérile pour un volume total de 2 mL. (figure 17)

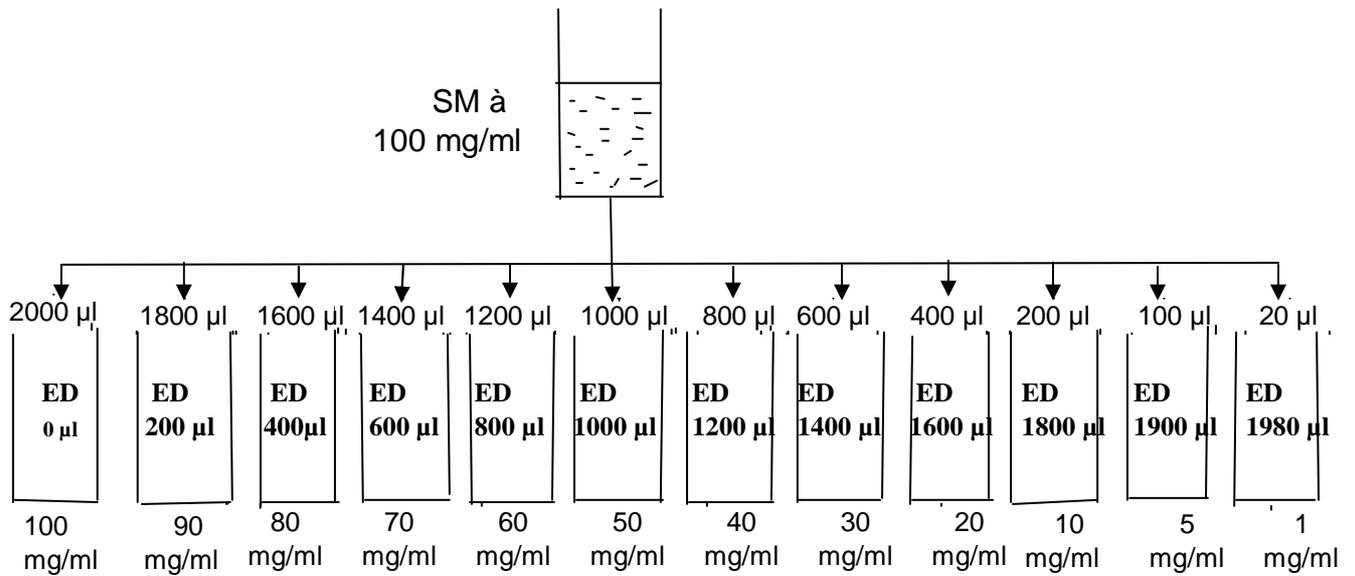


Figure 17 : Gamme de dilutions de la SM d'extraits à 100 mg/ml

b. Détermination des CMI des extraits végétaux

1^{er} jour

- Dans un petit tube à vis contenant 6 mL de BTS stérile, ensemencer une colonie moyenne (ou 2 petites colonies) de *E. coli* (SB1).
- A partir de cette suspension, réaliser trois dilutions successives (Figure 18)

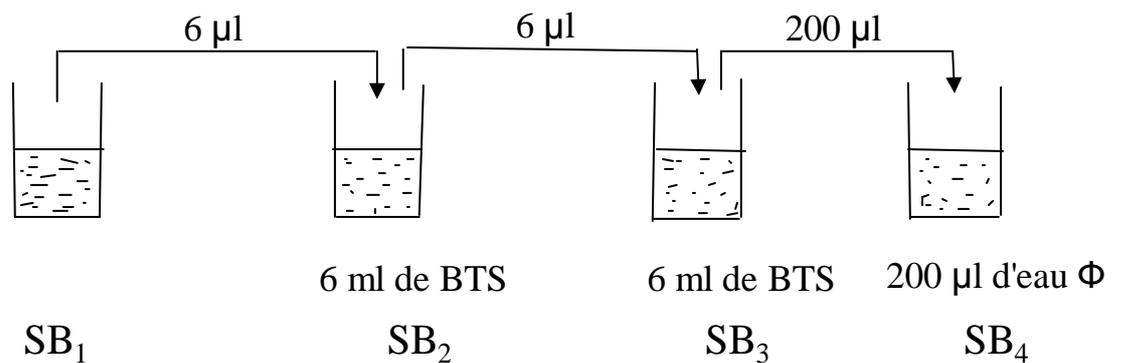


Figure 18 : Réalisation des suspensions bactériennes

- Incuber SB₄ à 37 °C pendant 18 h.

2^e jour

- A 6 μ L de SB₄, ajouter 12 mL d'eau Φ stérile (SB₅).
- Distribuer dans des boîtes de Pétri stériles 2 mL de la solution d'extraits de plante de la gamme de dilutions et 18 mL de gélose MH stérile chauffée et refroidie à environ 50 °C.

Remarque : Remplacer la solution d'extraits de plante par 2 mL d'eau distillée dans la boîte de Pétri témoin.

- Bien mélanger et laisser refroidir pour solidifier
- Sécher les boîtes de Pétri 30 min à 37 °C.
- Ensemencer SB₅ en stries radiales sur toutes les boîtes puis incuber à 37 °C pendant 18 h.

3^e jour

- Lire les CMI. La présence de 1 à 3 colonies n'est pas prise en considération. La CMI est la concentration la plus faible pour laquelle il n'y a pas de croissance visible de germes.

2.3.7- Etude biochimique

2.3.7.1- Extraction de la pénicillinase et de la BLSE de *E.coli*

Chaque souche de *E.coli* est cultivée sur 10 boîtes de Pétri contenant la gélose MH.

Les colonies sont entièrement prélevées et inoculées dans 100 mL de BTS.

Après 48 h d'incubation, les suspensions bactériennes sont centrifugées à la vitesse de 3000 tours/min pendant 2 min.

Le culot obtenu est lavé trois fois dans de l'eau physiologique stérile puis mis en suspension dans 10 mL de tampon de lyse et congelé à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Après décongélation, les bactéries sont soumises à un broyage dans du sable marin stérile par agitations au Vortex.

Le lysat est centrifugé à 3000 tours/min pendant 3 minutes.

Le surnageant est dialysé contre du tampon phosphate 0,01 M pH 7,0 pendant 12 h, puis concentré dans une membrane en présence de Polyéthylène - glycol.

Il est ensuite filtré sur filtre Millipore stérilisante ($0,22\text{ }\mu\text{m}$) sous vide.

Le filtrat obtenu est soumis à un test de stérilité par ensemencement sur gélose MH et BTS.

2.3.7.2- Détermination de l'activité pénicillinase et BLSE par spectrophotométrie d'absorption moléculaire dans le visible

a- Principe

La détermination de l'activité de la pénicillinase et de la BLSE produite par les souches de *E.coli* a été faite en s'inspirant du test acidimétrique en tube en milieu liquide de SYRE [55] décrite par COURVALLIN [21] (Figure 19).

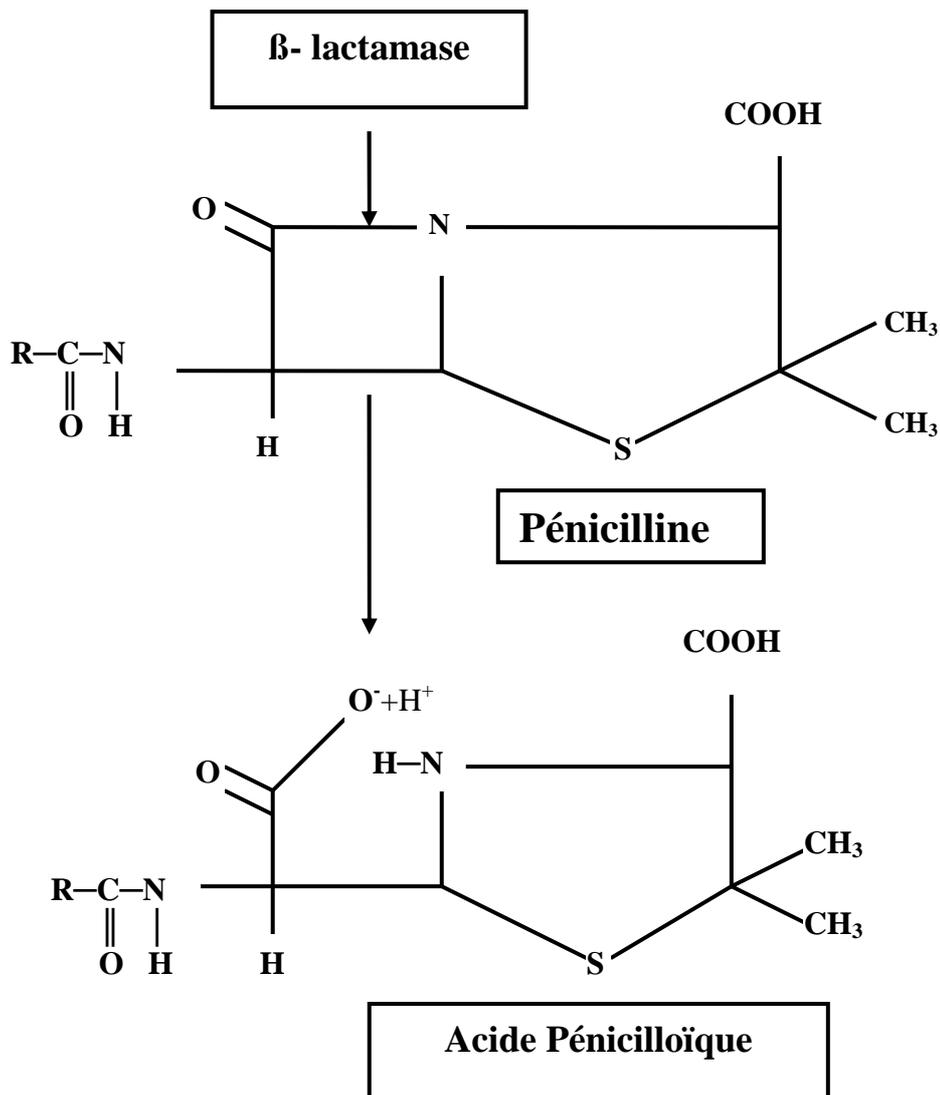


Figure 19 : Activité pénicillinase et BLSE

Le proton H^+ libéré va entraîner une acidification du milieu et un virage du rouge de phénol du rouge au jaune. Il s'ensuit une variation de DO qui est lue au spectrophotomètre.

Remarque

Le rouge de phénol est la phénolsulfonephthaléine. [Alpha-(4-hydroxonio-2,5-cyclohexadiène-1-ylidène)-alpha-(4-hydroxyphényl)-2-toluènesulfonate].

b- Cinétique enzymatique de la pénicillinase et de la BLSE dans le visible

Tableau VII : Mise en évidence d'une activité pénicillinase et BLSE

	Dosage	Témoin
Extrait brut de pénicillinase ou de BLSE	50 μ L	...
Eau distillée	500 μ L	550 μ L
Substrat-réactif	50 μ L	50 μ L

Faire le zéro optique sur l'eau distillée et lire la Densité optique (DO) toutes les 30 secondes pendant 3 minutes à 578 nm.

Une activité β -lactamase est mise en évidence par une diminution de la DO au cours du temps. (Tableau VII).

Remarque :

1- L'extrait brut de pénicillinase et de BLSE peut être dilué dans de l'eau physiologique.

2- Le témoin sert à vérifier la stabilité du substrat au cours de la réaction enzymatique.

c- Détermination de l'unité enzymatique

L'unité enzymatique est la quantité d'enzyme qui catalyse l'hydrolyse d'une μ mol/L de substrat par minute. Une droite d'étalonnage du substrat est réalisée.

* Droite d'étalonnage du rouge de phénol

A partir d'une solution-mère de substrat-réactif à 211,86 $\mu\text{mol/L}$ de rouge de phénol, on réalise une gamme de dilutions au 2/3, 1/2, 2/5, 1/3, 1/4, 1/5 et au 1/8^e dans de l'eau distillée. Les densités optiques correspondantes permettent de tracer la droite d'étalonnage du rouge de phénol à chaque série de déterminations.

* Activité enzymatique

La disparition d'une mole de Benzylpénicilline entraîne le virage d'une mole de rouge de phénol du rouge au jaune, donc la diminution de la concentration molaire de la Benzylpénicilline par minute correspond à la diminution de la concentration molaire du rouge de phénol par minute. L'activité enzymatique (AE) est obtenue par la formule :

$$\text{AE} = \Delta\text{DO} / \text{min} \times \text{F}$$

En appliquant la loi de BEER-LAMBERT [Kruh, 1971], on définit :

$$\text{F} = 1/\text{P} \times \text{V}_\text{R}/\text{V}_\text{e} = 1/\varepsilon \text{I} \times \text{V}_\text{R}/\text{V}_\text{e}$$

$$\text{P} = \varepsilon \text{l} ; \quad \varepsilon = \text{P}/\text{l}$$

P est la pente de la droite d'étalonnage du rouge de phénol ;

l est le trajet optique ;

V_R est le volume réactionnel ;

V_e est le volume de l'échantillon contenant l'enzyme ;

ε est le coefficient d'extinction molaire ;

A.E est exprimée en U

2.3.7.3- Méthodes spectrophotométriques en UV

a- Détermination de la longueur d'onde d'absorption optimale

Le spectre d'absorption de la Benzylpénicilline (200 µg/mL) est déterminé par balayage spectral entre 190 nm et 350 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 l'acide pénicilloïque (bonne spécificité)

b- Cinétique enzymatique dans l'UV

La cinétique enzymatique en UV a été faite suivant le protocole de AMRAM SAMUNI [7]. (Tableau VIII).

Tableau VIII : Mise en évidence de l'activité β - lactamase par la méthode en UV

	Dosage	Témoin
Extrait brut de β- lactamase	100 µL	-----
Benzylpénicilline 200 µg/mL	2 mL	2 mL
Tampon phosphate 10 mM, pH 7	-----	100 µL

Lecture à la longueur d'onde optimale toutes les 2 minutes pendant 10 minutes après avoir fait le zéro optique sur l'air.

2.3.7.4- Méthode chromatographique: chromatofocalisation

En préalable à la chromatofocalisation, les extraits bruts de pénicillinase et de BLSE ont été dialysés contre du tampon phosphate 10 mM, pH 7,0 afin d'éliminer l'EDTA.

Les extraits dialysés sont transférés dans une membrane (Cut off 6000 Daltons) et concentrés dans du PEG (Polyéthylène-glycol). Ensuite, ils sont filtrés sur membrane de stérilisation de 0,22 µm de diamètre.

Une colonne (1 cm x 9 cm ; 7,5 mL) de Polybuffer Exchanger PBE 94 est 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 pénicillinase ou de BLSE et lavage de la colonne avec le tampon de départ, l'élution est 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 est effectué dans l'UV à la longueur d'onde optimale et le profil protéique à 280 nm.

2.3.7.5- Détermination de la constante de Michaelis Menten (Km) et de la vitesse maximale (Vmax)

Après préparation du réactif- substrat, une gamme de dilutions est réalisée. (Tableau IX).

Tableau IX : Gamme de dilutions du substrat-réactif

Dilutions	1	3/4	2/3	1/2	1/3	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
Substrat réactif (µL)	0	150	200	100	50	50	50	50	50	50
Eau distillée (µL)	0	50	100	100	100	150	350	750	1550	3150

50 μL de chaque dilution sont ajoutés à 500 μL d'eau distillée et 50 μL de solution enzymatique.

Les DO sont lues toutes les minutes pendant 7 minutes. Le zéro optique étant fait sur l'eau distillée.

Les concentrations de la Benzylpénicilline dans le milieu réactionnel figurent dans le tableau X.

Tableau X : Concentration de la Benzylpénicilline dans le milieu réactionnel

Dilutions	1	3/4	2/3	1/2	1/3	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
[S]										
($\mu\text{mol/L}$)	140449	105337	93539	70225	46798	35112	17556	8792	4382	2191

La concentration de la Benzylpénicilline dans le milieu réactionnel et la mesure de la $\Delta\text{DO}/\text{min}$ à l'issue de la cinétique permettront de déterminer K_m et V_{max} .

2.3.7.6- Etude de la thermostabilité de la pénicillinase et de la BLSE

Une dilution appropriée dans du tampon phosphate 10 mM, pH 7,0 de chaque extrait de β -lactamase est répartie dans les tubes à hémolyse numérotés de 1 à 8. Les tubes n° 1 à 7 sont préincubés à 50 ° C respectivement pendant 5, 10, 20, 30, 45 et 60 minutes.

L'activité enzymatique est ensuite déterminée sur chacun des tubes préincubés et comparée à un témoin qui n'a pas été incubé en suivant le protocole du Tableau VII.

La courbe des variations du pourcentage d'activité enzymatique en fonction de la durée d'incubation est réalisée.

$$\text{Pourcentage d'activité enzymatique résiduelle} = \frac{\text{AE (tube incubé)}}{\text{AE (témoin)}} \times 100 \quad (\%)$$

2.3.7.7- Action des inhibiteurs sur la pénicillinase et la BLSE

2 g d'extraits totaux éthanoliques d'écorces de *Terminalia superba* sont dissous dans 20 mL d'eau distillée, puis filtrés sur membrane de stérilisation. Le filtrat obtenu à une concentration de 100 mg/mL.

Lors de la détermination de l'activité β -lactamase, on introduit dans un tube à hémolyse stérile en verre :

- Filtrat dilué au 1/5..... 60 μ L
- Extrait brut de pénicillinase ou de BLSE.....50 μ L

Mélanger et incuber à la température ambiante pendant 1 h (temps d'inhibition).

Ajouter au mélange 440 μ L d'eau distillée et 50 μ L du substrat réactif. L'extrait total végétal est alors à 2 mg/mL dans le milieu réactionnel.

Lire la DO à 578 nm à 37° C toutes les minutes pendant 3 minutes après avoir fait le zéro optique sur l'air. Déterminer l'activité résiduelle.

2.3.7.8. Détermination du pourcentage d'inhibition

Le pourcentage d'inhibition de la pénicillinase ou de la BLSE par les extraits totaux éthanoliques d'écorces de *Terminalia superba* est déterminé comme suit :

$$\text{PI} = \frac{\text{AE. (de base) - AE (résiduelle)}}{\text{AE (de base)}} \times 100$$

AE = Activité enzymatique

PI = Pourcentage d'inhibition

3- Résultats

3.1. Criblage phytochimique de *Terminalia superba*

L'étude phytochimique réalisée a permis de mettre en évidence dans les organes (feuilles, écorces, racines) de *Terminalia superba*, la présence de tanins galliques, de tanins catéchiques et d'antraquinones libres. Les racines et les écorces contiennent en plus des coumarines ; les mucilages ne sont présents que dans les feuilles et les écorces.

Tableau XI : Criblage phytochimique des organes (feuilles, écorces et racines) de *T. superba*

Composés phytochimiques	organes		
	Feuilles	Ecorces	Racines
Saponosides	-	-	-
Stéroïdes et triterpènes	-	-	-
Cardénolides	-	-	-
Dérivés quinoniques	-	-	-
Composés réducteurs	-	-	-
Mucilages	+++	+++	-
Flavonoïdes	-	-	-
Anthocyanes	-	-	-
Leucoanthocyanes	-	-	-
Tanins galliques	+	+	Traces
Tanins catéchiques	+	++	+
Dérivés cyanogénétiques	-	-	-
Dérivés anthracéniques libres	+	++	+
Dérivés anthracéniques combinés	-	-	-
Coumarines	-	+	+
Alcaloïdes	Mayer	-	-
	Dragendorff	-	-

- : réaction négative

+ : réaction positive

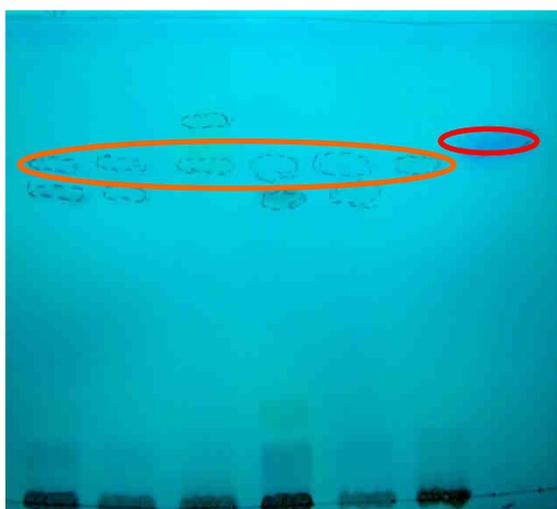
3.2. Analyse chromatographique sur couche mince

En tenant compte des résultats du screening phytochimique et de la revue bibliographique, nous avons tenté d'identifier par chromatographie sur couche mince, les coumarines et les dérivés anthracéniques des extraits d'organes de plante de *Terminalia superba*. Ce travail a été fait en utilisant des témoins : *Sene angustifolia folioles* (pour les dérivés anthracéniques) et 2 H-chromen-2-one (pour les coumarines).

* Les coumarines

A la lecture des plaques de CCM, on constate qu'il n'y a pas une grande variation de spots entre les extraits. Ils ont donc à peu près la même composition. On peut constater que les spots marqués par un cercle rouge (figure 21) ont un $R_f = 0,7$ proche de celui du témoin utilisé ($R_f = 0,75$). En plus, les couleurs des spots sont proches de celle du témoin coumarine.

TOLUENE-ETHER (0,5 -1) saturé à 10%
d'acide acétique ; révélateur : KOH à 7,5 %



Ee Re Fe E R F T

Légende :

- Ee : Extraits éthanoliques d'écorces
- Re : Extraits éthanoliques de racines
- Fe : Extraits éthanoliques de feuilles
- E : Extraits enrichis d'écorces
- R : Extraits enrichis de racines
- F : Extraits enrichis de feuilles
- T : Témoin coumarine

Figure 20 : CCM des extraits d'organes de *Terminalia superba* pour la mise en évidence des coumarines

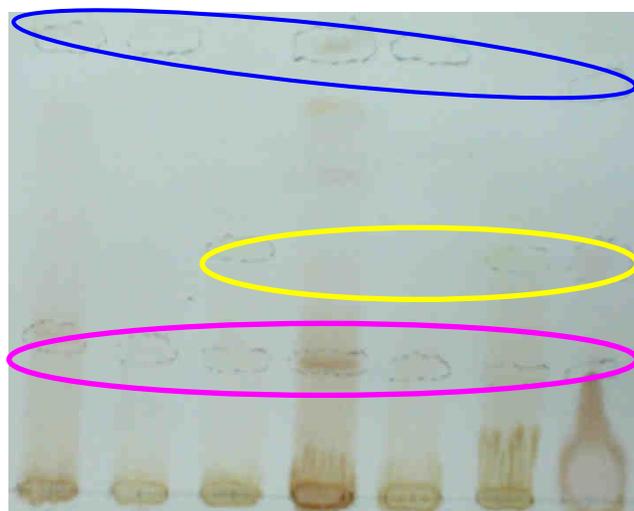
* Les dérivés anthracéniques

La lecture des plaques de CCM révèle au niveau du témoin la présence de trois spots dont les Rf sont respectivement 0,27 ; 0,47 et 0,82. Le témoin utilisé contient donc trois types d'anthracènes. Les spots marqués par un cercle violet (figure 22) ont tous le même Rf = 0,27. Les spots des extraits cerclés au jaune ont un Rf identique au 2^e spot du témoin (Rf = 0,47) alors que ceux des écorces et des racines cerclés au bleu ont un Rf = 0,9, proche de celui du témoin qui est égal à 0,82.

ACETATE D'ETHYLE- METHANOL- EAU (100- 17-13)

Révélateur : KOH à 7,5%

Légende :



Ee : Extraits éthanoliques d'écorces
Re : Extraits éthanoliques de racines
Fe : Extraits éthanoliques de feuilles
E : Extraits enrichis d'écorces
R : Extraits enrichis de racines
F : Extraits enrichis de feuilles
T : Témoin anthracène

Ee Re Fe E R F T

Figure 21 : CCM des extraits d'organes de *Terminalia superba* pour la mise en évidence des dérivés anthracéniques

3.3. Rendement des différentes extractions

Les rendements des différentes extractions figurent dans le Tableau XII.

3.3.1. Extraits totaux

Le meilleur rendement est obtenu avec les extraits totaux méthanoliques d'écorces (27 %).

3.3.2. Extractions par polarités croissantes de solvants

Le rendement le plus élevé (14 %) est obtenu avec l'extraction à l'eau sur les écorces ; le plus faible (1 %) est celui de l'acétate d'éthyle à partir des racines. On constate qu'à l'instar des extraits totaux, les meilleurs rendements ont été obtenus à partir des écorces.

Tableau XII : 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 %	-

Extraction par polarité croissante de solvant (B)				
	Organes	Feuilles	Ecorces	Racines
Dichlorométhane		9 %	4 %	2 %
Acétate d'éthyle		2 %	3 %	1 %
Méthanol		4 %	12 %	2 %
Eau		2 %	14 %	3 %

3.3.3. Extraits spécifiques

Au regard des rendements des extractions, des CCM et des CMI obtenus, nous avons orienté nos recherches sur les écorces de *Terminalia superba*. L'extraction spécifique a porté sur des coumarines, des dérivés anthracéniques, des tanins et des mucilages dont les rendements sont respectivement de 15 %, 10 %, 3 % et 1,2 % (Tableau XIII).

Tableau XIII : Rendement des extraits spécifiques

Composés phytochimiques	Rendement
Coumarines	15 %
Dérivés anthracéniques	10 %
Tanins	3 %
Mucilages	1,2 %

3.4. Etude bactériologique

3.4.1. Identification de deux souches de *E. coli* productrices de β -lactamases et détermination de leurs phénotypes de résistance

L'antibiogramme réalisé sur les souches de *E.coli* a permis d'identifier une souche de *E. coli* productrice de pénicillinase et une souche de *E.coli* productrice de BLSE.

✓ La 1^{ère} souche est résistante à l'Amoxicilline et est sensible aux autres β -lactamines : Amoxicilline + Acide clavulanique, Ceftriazone, Aztréonam, Céfotaxime, Imipénem, Céfazoline, Céfalotine. (Figure 22).

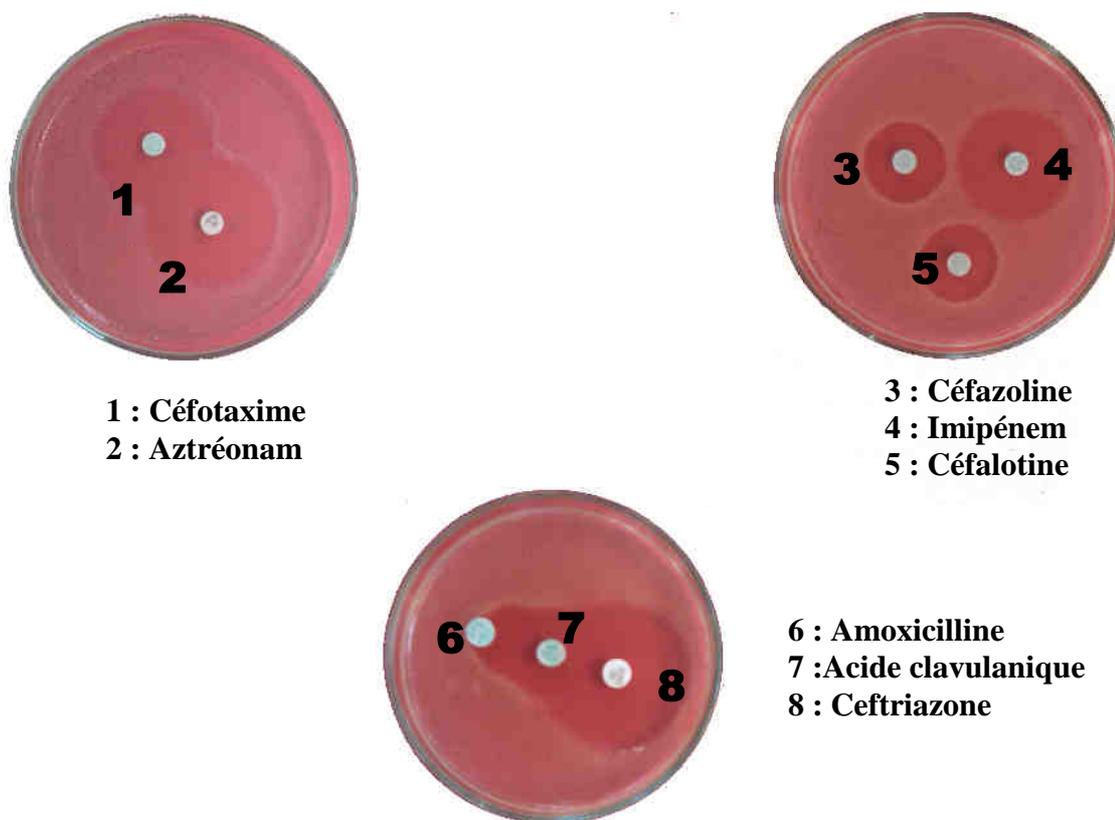


Figure 22 : Antibiogramme de la souche de *E. coli* productrice de pénicillinase

La nette sensibilité obtenue avec l'association Amoxicilline et Acide clavulanique traduit la présence chez cette souche d'une pénicillinase inhibée par l'Acide clavulanique.

Par ailleurs, cette souche est sensible aux :

- Quinolones (Ciprofloxacilline, Ofloxacine, Acide nalidixique)
- Aminosides (Netilmicine, Gentamicine)
- Nitroxoline.

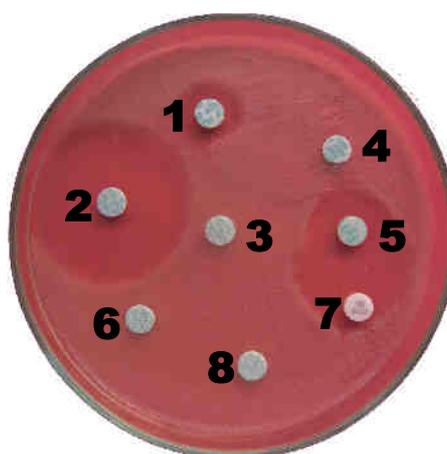
Elle est résistante à la Doxycycline.

✓ La souche productrice de BLSE est résistante à toutes les β -lactamines sauf à l'Imipénem.

La petite zone d'inhibition obtenue autour du disque d'Amoxicilline + Acide clavulanique, témoigne d'une faible inhibition de la β -lactamase par l'Acide clavulanique ; inhibition insuffisante pour redonner son activité à l'Amoxicilline.

Il s'agit donc d'une souche de *E. coli* productrice de β -lactamase à spectre élargi résistante à l'inhibiteur (BLSE- IRT).

Par ailleurs, cette souche est également résistante à la Nitroxoline, aux Quinolones, Aminosides, Tétracyclines ainsi qu'aux Polypeptides (Colistine), et aux Sulfamides (Sulfaméthoxazol-triméthoprim). Elle est sensible au Chloramphénicol. (Figure 23)



- | | |
|------------------|------------------------|
| 1 : Aztréonam | 5 : Acide clavulanique |
| 2 : Imipénem | 6 : Céfotaxime |
| 3 : Céfalotine | 7 : Ceftriazone |
| 4 : Amoxicilline | 8 : Céfazoline |

Figure 23 : Antibiogramme de la souche de *E. coli* productrice de BLSE

3.4.2. Mise en évidence de la production de β - lactamase par les souches de *E.coli*

L'addition de la suspension bactérienne au réactif Benzylpénicilline au rouge de phénol a entraîné un virage franc du milieu du rouge au jaune en 60 minutes pour la souche de *E.coli* productrice de pénicillinase et en 15 minutes pour

la souche de *E.coli* productrice de BLSE .Ce virage est dû à l'acidification du milieu réactionnel à l'issue de l'hydrolyse de la Benzylpénicilline en acide pénicilloïque par la β -lactamase produite par *E. coli*.

3.4.3. Test d'inhibition de la croissance des souches de *E. coli* par les extraits totaux éthanoliques

En préalable à la détermination des CMI, les extraits totaux de feuilles, d'écorces et de racines ont été testés. A la concentration de 100 mg/ mL, tous ces extraits inhibent à 100 % la croissance des deux souches de *E. coli*.

3.4.4. Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) des extraits végétaux sur les souches de *E. coli* productrices de β - lactamases

3.4.4.1. Extraits totaux

Les CMI des extraits totaux éthanoliques, méthanoliques et aqueux d'écorces ont été réalisées sur les deux souches d'*E. coli*. La CMI la plus faible est obtenue pour les extraits totaux éthanoliques d'écorces (1 mg/ mL pour les deux souches).

Tableau XIV : CMI des extraits totaux d'organes

Organes souches	Feuilles		Ecorces		Racines	
	P P	P BLSE	P P	P BLSE	P P	P BLSE
Extraits totaux						
Ethanoliques (mg/mL)	4	4	1	1	3	4
Méthanoliques (mg/mL)	-	-	4	5	-	-
Aqueux (mg/mL)	-	-	4	4	-	-

P P : Productrice de Pénicillinase

P BLSE : Productrice de β -lactamase à spectre élargi

3.4.4.2. Extraits par polarités croissantes de solvants

De tous les solvants utilisés (dichlorométhane, acétate d'éthyle, méthanol et eau), le méthanol est le solvant qui extrait plus de produits phytochimiques à activité inhibitrice sur la souche de *E. coli* productrice de BLSE. En effet, les extraits méthanoliques de feuilles, de racines et d'écorces présentent les CMI les plus basses (4 mg/mL).

Tableau XV: CMI des extraits par polarités croissantes de solvants sur la souche de *E. coli* productrice de BLSE

Organes	Feuilles	Ecorces	Racines
Solvants			
Dichlorométhane	> 10 mg/mL	8 mg/mL	> 10 mg/mL
Acétate d'éthyle	> 10 mg/mL	6 mg/mL	> 10 mg/mL
Méthanol	4 mg/mL	4 mg/mL	4 mg/ mL
Eau	10 mg/mL	10 mg/mL	10 mg/ml

3.4.4.3. Extraits spécifiques

Les CMI déterminées sur les dérivés coumariniques, anthracéniques, taniques extraits d'écorces de *Terminalia superba* ont des valeurs comparables pour les deux souches de *E. coli* (CMI variant dans un intervalle de 4 à 6 mg/mL). Les mucilages ont des CMI plus élevées (> 10 mg/mL).

Tableau XVI : CMI des extraits spécifiques

Extraits	Souches	P P	P BLSE
Coumarines		4 mg/mL	4 mg/mL
Dérivés anthracéniques		6 mg/mL	5 mg/mL
Tanins		6 mg/mL	5 mg/mL
Mucilages		> 10 mg/mL	> 10 mg/mL

P P : Productrice de Pénicillinase

P BLSE : Productrice de β -lactamase à spectre élargi

3.5 Etudes biochimiques

3.5.1- Extraction de la pénicillinase et de la BLSE de *E.coli*

Les contrôles de stérilité des extraits bruts de pénicillinase et de BLSE à l'issue de la filtration stérilisante ont été satisfaisants. La dialyse a permis d'extraire de la solution enzymatique, l'EDTA (inhibiteur potentiel de l'activité β -lactamase).

Par ailleurs, le passage sur Polyéthylène glycol (PEG) a permis de concentrer l'activité β -lactamase en moyenne 10 fois.

3.5.2- Détermination de l'activité pénicillinase et BLSE par spectrophotométrie d'absorption moléculaire dans le visible

3.5.2.1- Droite d'étalonnage du substrat-réactif au rouge de phénol dans le visible

La lecture spectrophotométrique de la gamme de dilutions de la solution-mère du substrat- réactif au rouge de phénol à 578 nm a permis d'obtenir une courbe encore linéaire entre 26 et 211 $\mu\text{mol/L}$, correspondant respectivement aux DO allant de 0,100 à 1,232 .(Tableau XVII, Figure 24).

Tableau XVII : Gamme d'étalonnage du rouge de phénol

N° de Tubes	1	2	3	4	5	6	7
Dilutions	1	2/3	1/2	2/5	1/3	1/5	1/8
Concentrations ($\mu\text{mol/L}$)	211	141	105	84	70	42	26
DO lues	1,232	0,816	0,638	0,490	0,415	0,217	0,100

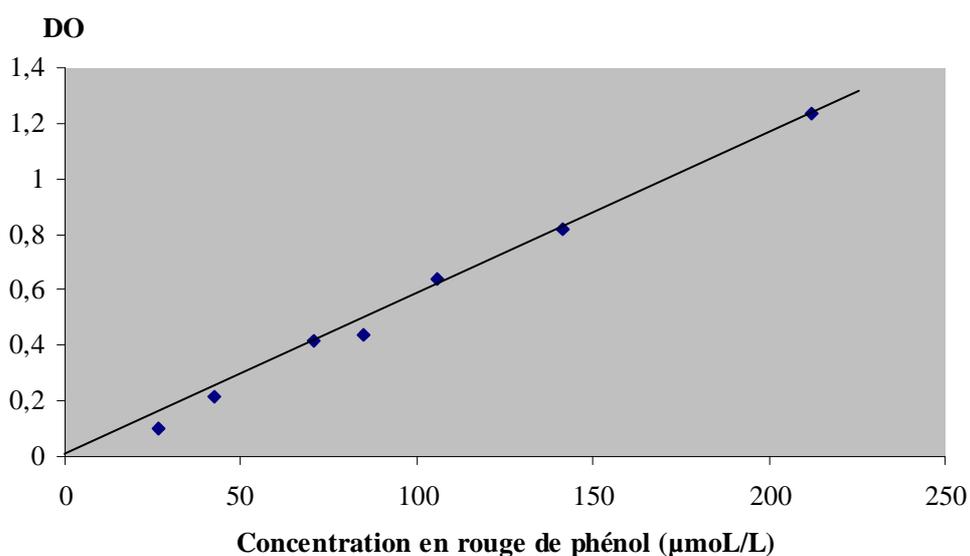


Figure 24 : Droite d'étalonnage du substrat-réactif au rouge de phénol

3.5.2.2- Etude de la cinétique enzymatique de la pénicillinase et de la BLSE dans le visible

Au cours de l'hydrolyse du substrat-réactif au rouge de phénol par les extraits bruts de pénicillinase et de BLSE, les résultats suivants sont obtenus (Tableau XVIII).

Tableau XVIII : Variations des DO par minute du rouge de phénol au cours de l'hydrolyse de la pénicillinase et la BLSE.

Enzymes	$\Delta DO/min$
Pénicillinase	- 0,023
BLSE	- 0,042

Il s'agit ici d'une cinétique décroissante avec des $\Delta DO/min$ constantes au cours de la lecture sur 3 minutes avec des moyennes de -0,023/min et -0,042/min respectivement pour la pénicillinase et pour la BLSE.

L'unité enzymatique est la quantité d'enzyme qui hydrolyse une $\mu mol/L$ de substrat par minute. Le substrat réel des β -lactamases étudiées est la benzylpénicilline. Au cours de l'hydrolyse enzymatique, la réaction se déroule mole à mole dans le milieu réactionnel.

La transformation d'une mole de rouge de phénol est corrélée à l'hydrolyse par la β -lactamase d'une mole de benzylpénicilline en acide pénicilloïque.

Donc la vitesse de transformation en $\mu mol/L/min$ du rouge de phénol est égale à la vitesse de transformation de la benzylpénicilline en acide pénicilloïque en $\mu mol/L/min$.

Soit **P** la pente de la droite d'étalonnage du substrat-réactif au rouge de phénol.

$$P = \frac{\sum_{n=1}^7 DO_n/C_n}{n}$$

n étant le nombre de dilutions faites.

En utilisant les données du tableau XVII, on obtient : **P = 5,449 10⁻³ (μmol/L)⁻¹**

Si **V** est la vitesse de la réaction :

$$V = \Delta C/\text{min} = \frac{\Delta DO/\text{min}}{P}$$

Pour la pénicillinase :

$$V = \frac{0,023}{5,449 \cdot 10^{-3}} = 4,22 \mu\text{mol/L/min}$$

Pour la BLSE :

$$V = \frac{0,042}{5,449 \cdot 10^{-3}} = 7,707 \mu\text{mol/L/min}$$

Ces valeurs correspondent à une dilution des échantillons égale à

$$V_e/V_r = 1/12 \text{ avec } V_e = 50 \mu\text{L} \text{ et } V_r = 600 \mu\text{L}.$$

L'activité enzymatique réelle de chaque échantillon est :

$$AE = \Delta C/\text{min} \times V_r / V_e$$

$$AE = \frac{\Delta DO/min}{P} \times 12$$

On obtient alors :

- AE de la pénicillinase : **50 U** et
- AE de la BLSE : **92 U**.

$$AE = \Delta DO/min \times 1/P \times Vr/Ve$$

On en déduit un Facteur **F** de l'activité enzymatique :

$$F = 1/P \times Vr/Ve \quad \text{Soit } F = 1/ 5,449 \cdot 10^{-3} \times 12 = 2202,24$$

En appliquant la loi de BEER- LAMBERT :

$$P = \epsilon l \text{ d'où } \epsilon = P/l \quad \text{Soit } \epsilon = 5,449 \cdot 10^{-3} \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{L}\cdot\text{cm}^{-1}$$

ϵ est le coefficient d'extinction molaire et

l est la longueur du trajet optique (ici $l = 1\text{cm}$).

3.5.3- Longueur d'onde d'absorption optimale de la Benzylpenicilline à 200 µg/mL dans l'Ultra-Violet (UV)

Le spectre d'absorption dans l'UV de la Benzylpénicilline à 200 µg/mL présente une absorption maximale à 220 nm.

De plus, il présente une absorption non négligeable à 240 nm (DO = 0,52) dans nos conditions opératoires (Figure 25).

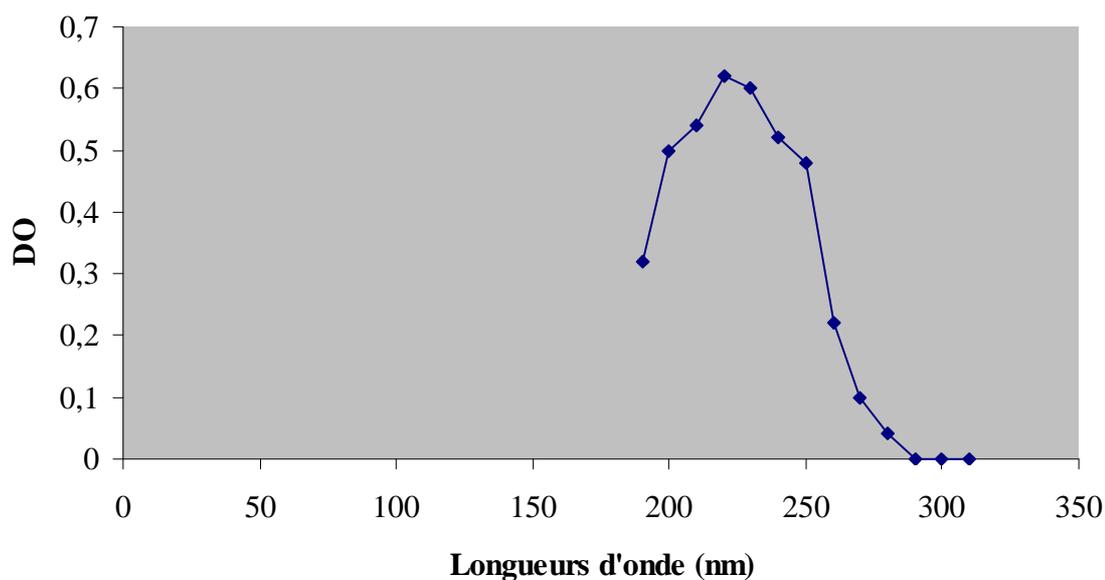


Figure 25 : Spectre d'absorption dans l'UV de la Benzylpénicilline à 200 µg/mL en Tampon phosphate 10 mM, pH 7,0

3.5.4- Droite d'étalonnage du substrat benzylpénicilline dans l'UV

La lecture spectrophotométrique de la gamme de dilutions de la solution mère du substrat Benzylpénicilline à 240 nm a permis d'obtenir une courbe encore linéaire à 1mg/mL correspondant à une DO de 2,583. (Tableau XIX, Figure 26).

Tableau XIX : Gamme d'étalonnage de la Benzylpénicilline

Dilutions	1/5	1/10	3/50	1/25	1/50	1/100
[Benzylpénicilline] ($\mu\text{g/mL}$)	1000	500	300	200	100	50
DO lues	2,583	1,313	0,742	0,544	0,282	0,174

[Benzylpénicilline]= Concentration de la Benzylpénicilline.

DO (240 nm)

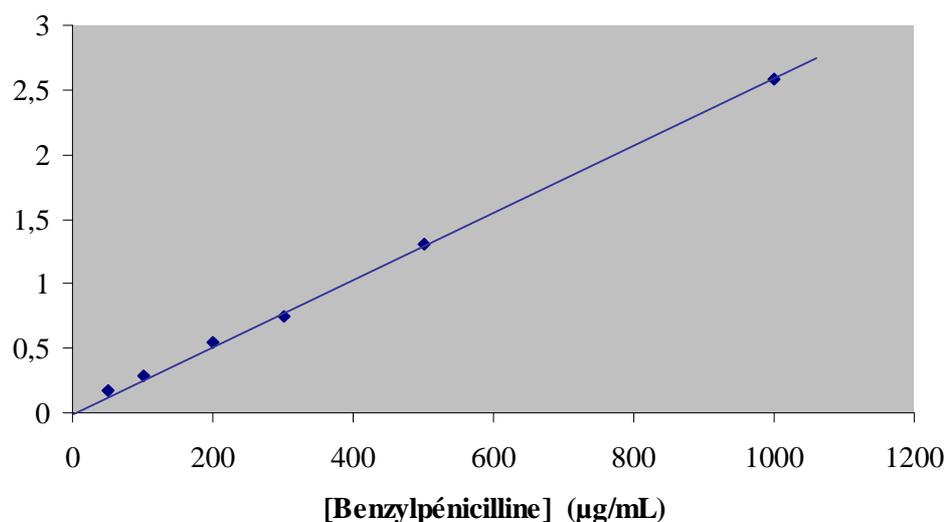


Figure 26 : Droite d'étalonnage de la Benzylpénicilline en Tampon phosphate 10 mM , pH 7,0

3.5.5- Profil d'élution de la pénicillinase et de la BLSE par chromatofocalisation

Par chromatofocalisation, l'activité pénicillinase et BLSE sont éluées dans le gradient de pH en un seul pic respectivement à pH 5,4 et 6,4 (Figures 27, 28).

Ces pics d'activité BLSE et pénicillinase sont bien isolés des pics d'élution des autres protéines constituant le profil protéique.

En somme, on peut retenir que par chromatofocalisation, la pénicillinase et la BLSE présentent respectivement des pHi de 5,4 et 6,4.

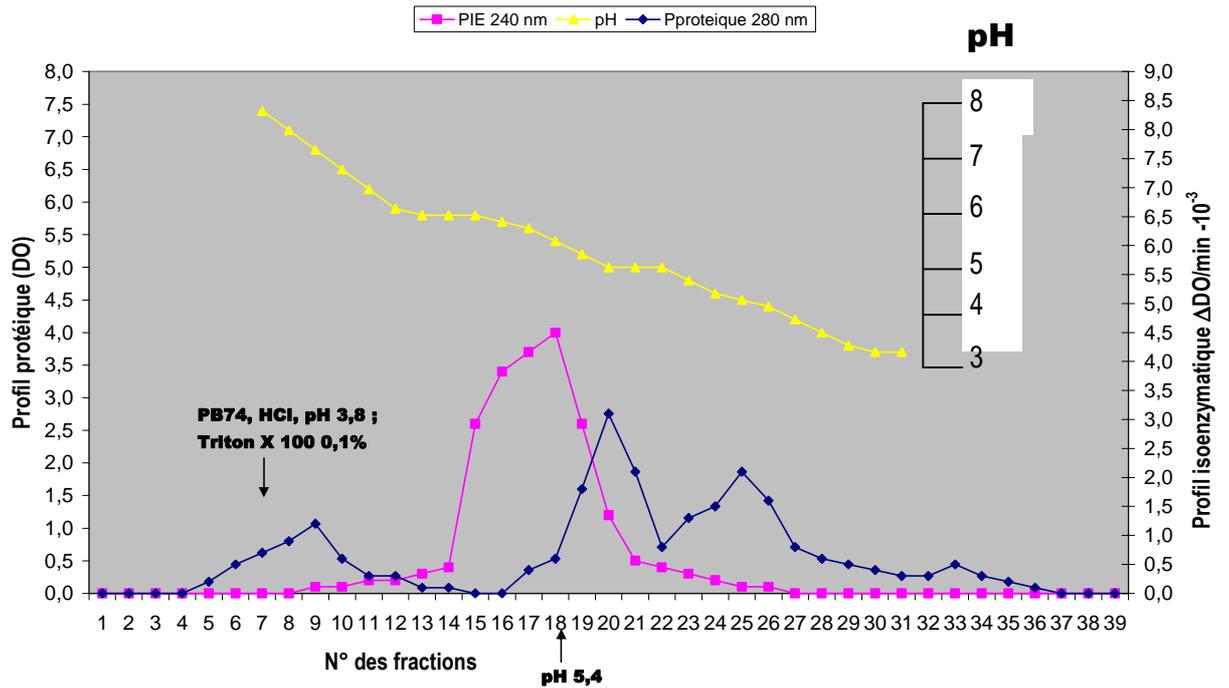


Figure 27 : Profil d'élution de l'activité pénicillinase par chromatofocalisation

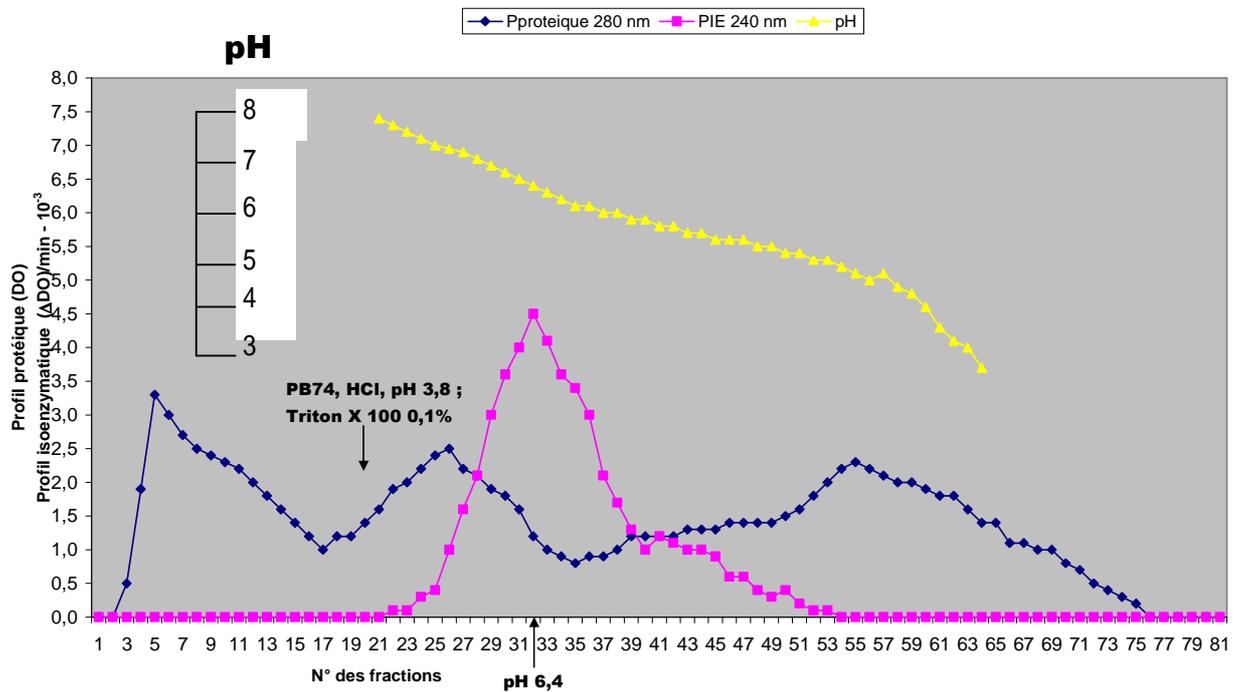


Figure 28 : Profil d'élution de l'activité BLSE par Chromatofocalisation

3.5.6. Détermination des k_m et v_{max} de la pénicillinase et de la BLSE

Selon la représentation de LINEWEAVER et BURK :

- La pénicillinase a un K_m de 32787 $\mu\text{mol/L}$ pour la benzylpénicilline, ce qui correspond à une affinité ($1/K_m$) égale $3,05 \cdot 10^{-5} (\mu\text{mol/L})^{-1}$ et à une vitesse maximale (V_{max}) de 0,99 $\mu\text{mol/L/min}$. (Tableau XX, Figure 29).
- La BLSE a un K_m de 6250 $\mu\text{mol/L}$ pour la benzylpénicilline, ce qui correspond à une affinité ($1/K_m$) égale $16 \times 10^{-5} (\mu\text{mol/L})^{-1}$. Sa vitesse maximale (V_{max}) est égale à 3,49 $\mu\text{mol/L/min}$. (Tableau XXI, Figure 30).

Tableau XX : Détermination des Km et Vmax de la pénicillinase

N° de Tubes	1	2	3	4	5	6	7
Dilutions	1/32	1/16	1/8	1/4	1/3	1/2	1
[s] ($\mu\text{mol/L}$)	4382	8770	17556	35112	46816	70225	140449
Vi ($\mu\text{mol/L/min}$)	0,12	0,21	0,34	0,51	0,58	0,67	0,80
1/[s] ($\mu\text{mol/L}$) ⁻¹ X 10 ⁻⁴	2,28	1,14	0,57	0,28	0,21	0,17	0,14
1/Vi ($\mu\text{mol/L/min}$) ⁻¹	8,57	4,78	2,89	1,95	1,71	1,48	1,25

[s] = Concentration en Benzylpénicilline
Vi = Vitesse initiale

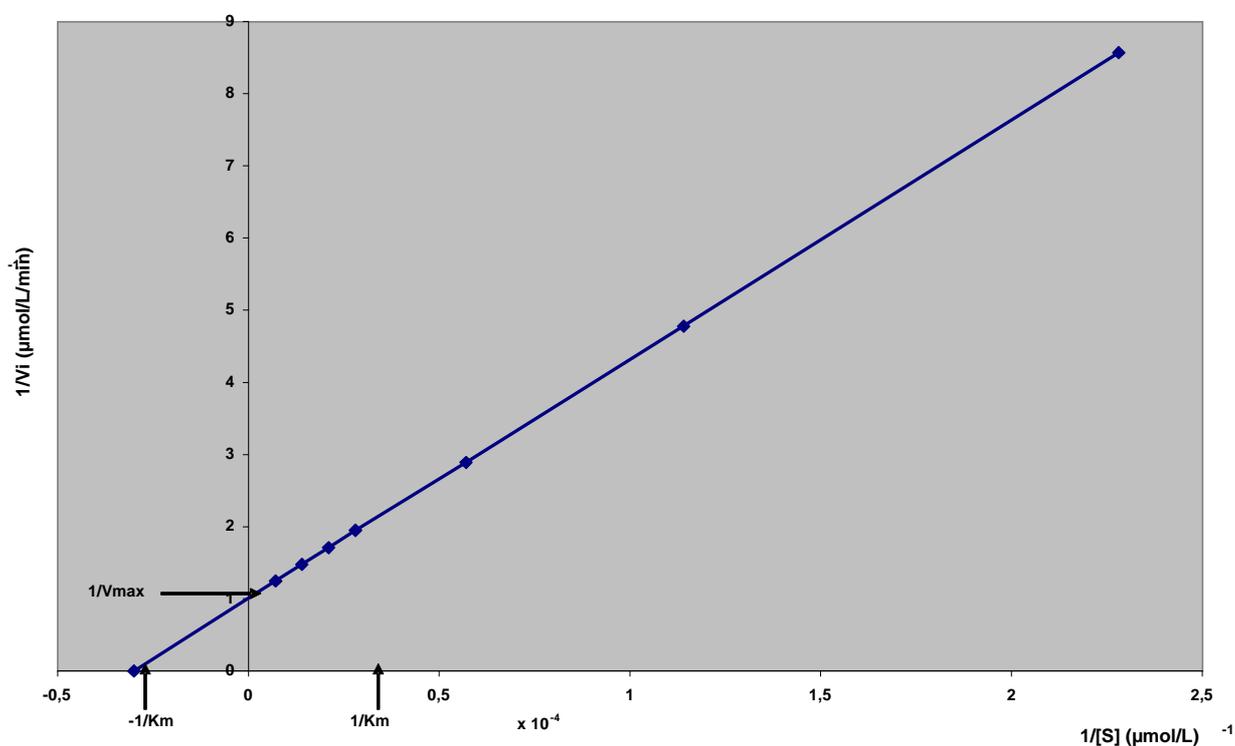


Figure 29 : Détermination des Km et Vmax de la pénicillinase

Tableau XXI : Détermination des Km et Vmax de la BLSE

N° de Tubes	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Dilutions	1/64	1/32	1/24	1/12	1/3	1/2	2/3	3/4	1
[s] (µmol/L)	2022	4045	8064	16077	43202	64831	86433	97247	129635
Vi (µmol/L/min)	0,89	1,37	1,97	2,52	3,05	3,19	3,26	3,28	3,34
1/[s] (µmol/L) ⁻¹ x 10 ⁻⁵	49,44	24,72	12,4	6,22	2,31	1,54	1,16	1,03	0,77
1/Vi (µmol/L/min) ⁻¹	1,117	0,73	0,508	0,397	0,327	0,313	0,306	0,304	0,29

[s] = Concentration en Benzylpénicilline

Vi = Vitesse initiale

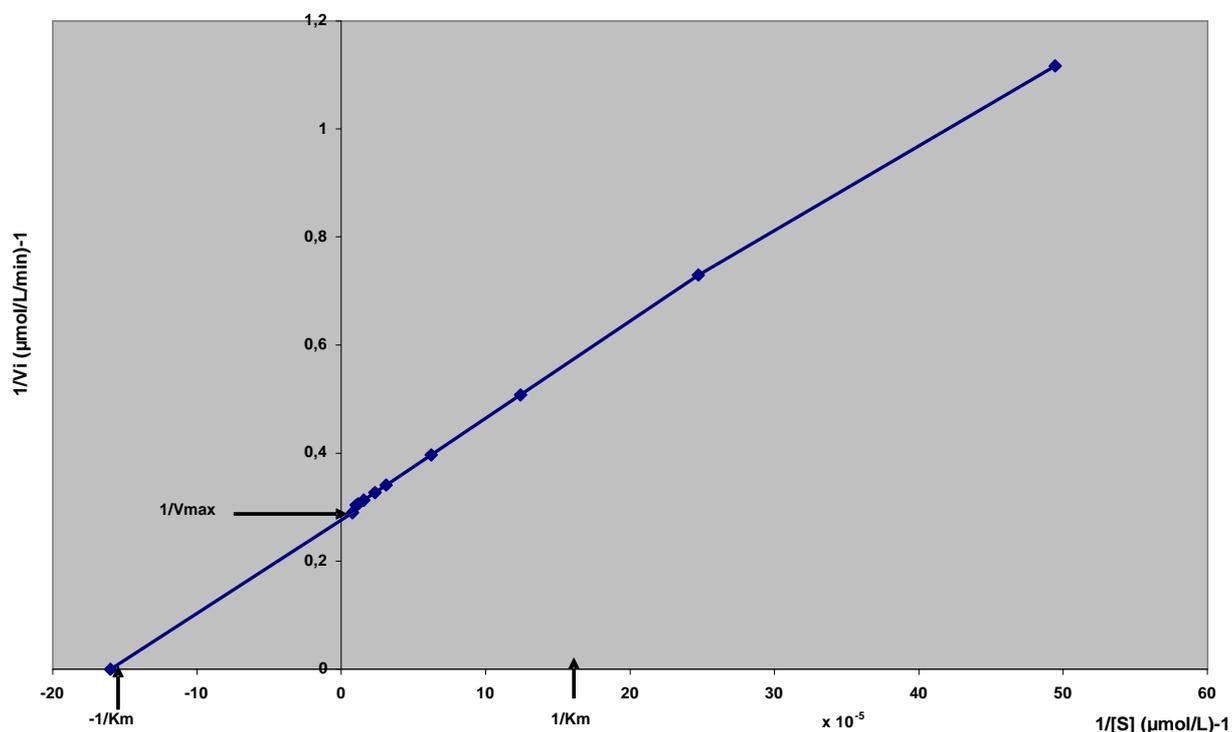


Figure 30 : Détermination des Km et Vmax de la BLSE

3.5.7. Etude de la thermostabilité de la pénicillinase et de la BLSE

A 50 °C, la pénicillinase conserve 38 % de son activité après 10min et 22 % après 60 minutes (Figure 31).

Dans les mêmes conditions, la BLSE ne conserve que 15 % de son activité après 10 min et 5 % après 60 min (Figure 32).

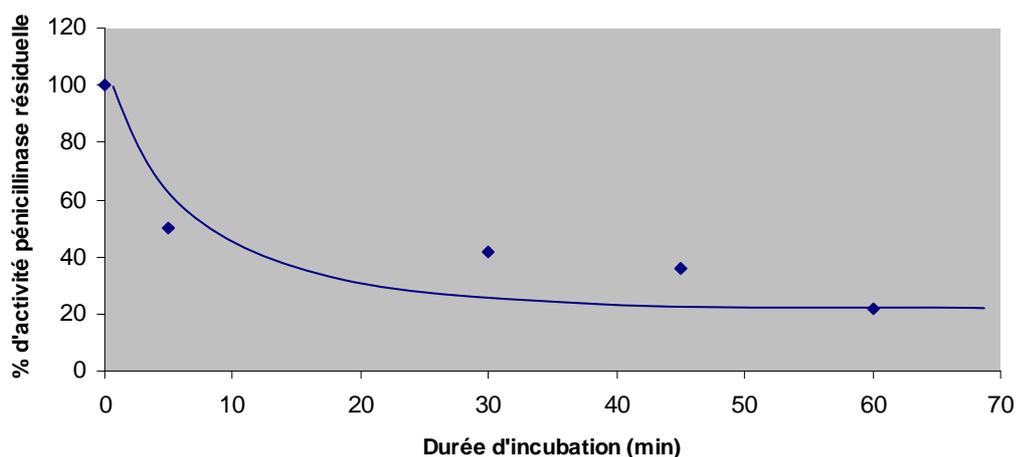


Figure 31 : Thermostabilité de la pénicillinase à 50° C

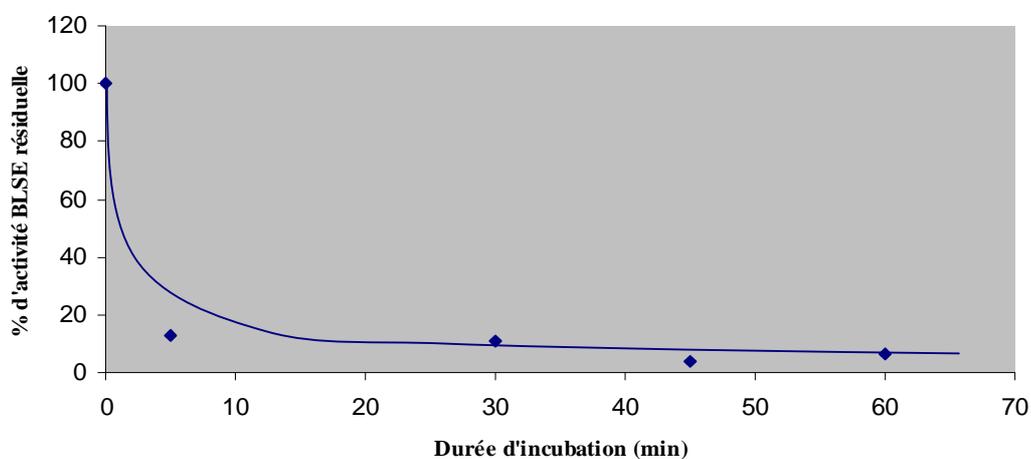


Figure 32 : Thermostabilité de la BLSE à 50° C

3.5.8-Inhibition de la pénicillinase et de la BLSE de *E .coli* par *Terminalia superba*

Les résultats des tests d'inhibition de la pénicillinase et de la BLSE par les extraits totaux éthanoliques d'écorces de *Terminalia superba* sont indiqués dans le Tableau XXII.

Tableau XXII : Inhibition de la pénicillinase et de la BLSE de *E. coli* par les extraits totaux éthanoliques d'écorces de *Terminalia superba*.

Enzymes	Pourcentage d'inhibition en %
Activité pénicillinase	65
Activité BLSE	81

A la concentration de 2 mg/mL dans le milieu réactionnel, les extraits totaux éthanoliques d'écorces de *Terminalia superba* inhibent la pénicillinase et la BLSE respectivement à 65 % et 81 %.

4- Discussion

4. 1 Action inhibitrice d'extraits de *Terminalia superba* sur des souches de *Escherichia coli* productrices de β -lactamases.

Terminalia superba est un arbre très répandu de la Guinée jusqu'au Congo; [12] il est très largement utilisé en médecine traditionnelle pour ses propriétés thérapeutiques. Ce sont surtout les écorces qui sont employées; les écorces auraient de propriétés émétiques ou expectorantes. Seules ou en association elles servent à soigner les affections broncho-pulmonaires. La macération d'écorces est utilisée contre les oedèmes et les douleurs généralisées. [6] Elle est aussi utilisée dans le traitement de la blennorragie et de la diarrhée. [44] La poudre d'écorces est utilisée contre le diabète sucré. [3; 37] La tisane d'écorces est anti-dysentérique. On l'administre aussi aux femmes stériles ou menacées de fausses-couches, ou à celles qui présentent des troubles ovariens. [12] La pulpe des feuilles est employée en bains de bouche contre les gingivites et les aphtes [12; 44]. Elle est aussi utilisée contre les rhumatismes, les oedèmes, la toux et l'angine. Le suc de feuilles soigne la conjonctivite [44].

Dans le but de vérifier les propriétés pharmacologiques (antibactériennes) de *Terminalia superba* et de mieux comprendre le mécanisme d'action de cette plante nous avons effectué une étude portant sur la phytochimie et l'action inhibitrice de *Terminalia superba* sur des souches de *Escherichia coli* productrices de β -lactamases.

Les données de la littérature révèlent la présence de plusieurs composés phytochimiques dans les extraits d'organes de *Terminalia superba*.

Les tanins ont été signalés dans les écorces par plusieurs auteurs. [27; 8; 38; 56]. Anderson et coll. [1] a évoqué la présence des mucilages. *Terminalia superba* recèle également des alcaloïdes [19 ; 23].

Nos résultats obtenus lors du criblage phytochimique, à partir de poudres d'écorces, de racines, et de feuilles de *T. superba* confirment la présence de tanins galliques et catéchiques ainsi que celle de mucilages. En plus, ils ont révélé la

présence de dérivés anthracéniques et de coumarines. A notre connaissance, ces deux dernières familles de composés phytochimiques n'ont pas été signalées dans la littérature pour *T. superba*. Les saponosides, les stéroïdes et triterpènes, les cardénolides, les dérivés quinoniques, les composés réducteurs, les flavonoïdes, les anthocyanes, les leucoanthocyanes, les dérivés cyanogénétiques et les alcaloïdes n'ont pas été retrouvés dans nos échantillons. Les données de la littérature concernant la composition phytochimique de *T. superba* sont hétérogènes [23; 38; 56; 8; 19]. Nous pouvons donc évoquer l'hypothèse de la variation de la composition phytochimique en fonction des données agro- climatiques et du degré de maturité de l'espèce végétale: c'est le chemotype.

Les résultats de la CCM indiquent que soit, les coumarines sont présentes dans la plante mais en faibles quantités, soit que le témoin coumarine utilisé n'est pas du même type que les coumarines contenues dans la plante. Mais en tenant compte des résultats du criblage phytochimique et des remarques sur les résultats d'analyse par CCM des coumarines par Wagner et coll. [57], on peut dire que les coumarines sont bien présentes dans les différents extraits d'organes de plante.

Par ailleurs, on peut affirmer qu'il existe dans les trois organes (écorces, racines et feuilles), un type de dérivé anthracénique. De plus les écorces et les racines présentent un autre type de dérivé anthracénique qui ne se retrouve pas dans les feuilles.

Au regard des rendements obtenus pour les extraits totaux d'écorces, plus du ¼ des substances chimiques (27%) sont extractibles par le méthanol. Le méthanol semble être le meilleur solvant d'extraction pour cet organe comparé à un rendement de 12% pour l'eau (Tableau XIIA). Par ailleurs, lors de l'extraction par polarités croissantes de solvants, le méthanol et l'eau semblent avoir les meilleures propriétés extractives (respectivement 12% et 14%) à partir des écorces (Tableau XIIB). On en déduit que la majorité des constituants ont une affinité plus marquée pour les solvants polaires. Ces résultats pourraient justifier l'usage des décoctions

(extraits aqueux) [12] en médecine traditionnelle. Cependant le rendement ne saurait en aucun cas préjuger, ni de la concentration des molécules actives dans les extraits obtenus avec chaque solvant, ni de leur activité antibactérienne.

Tous les constituants de notre plante (tanins, coumarines, dérivés anthracéniques et mucilages) possèderaient des propriétés antibactériennes. [17; 22] Lesquels de ces constituants seraient-ils à l'origine de l'inhibition de la croissance des souches de *E. coli* ?

Deux souches de *E. coli* ont été isolées et identifiées. L'antibiogramme en milieu solide réalisé sur les deux souches de *E. coli* confirme que la première souche est productrice de pénicillinase sensible à l'inhibiteur de β -lactamase (Acide clavulanique). La deuxième souche se révèle résistante aussi bien aux pénicillines et céphalosporines de 3^{ème} génération testées qu'à l'inhibiteur de β -lactamase. Il s'agit bien d'une souche BLSE-IRT.

Lors de la mise en évidence de la production de β -lactamase par la méthode acidimétrique de SYRE sur les souches de *E. coli*, la rapidité de la réaction d'hydrolyse observée chez *E. coli* productrice de BLSE semble témoigner d'une activité catalytique plus accrue de ce type de β -lactamase sur la Benzylpénicilline en comparaison à la pénicillinase.

L'inhibition de la croissance des deux souches de *E. coli* a été obtenue avec une concentration de 100 mg/ml d'extraits totaux éthanoliques d'organes (feuilles, racines, écorces) dans le milieu. Cette concentration a été retenue en référence à celles relevées dans la littérature pour l'évaluation des propriétés antimicrobiennes d'extraits de plantes [53 ; 35 ; 36]. Il s'agit d'une concentration relativement élevée qui permettrait d'éviter des résultats faussement négatifs (présence de germes à haut niveau de résistance aux principes actifs antibactériens). Ces extraits totaux ont inhibé à 100% les souches de *E. coli* productrices de pénicillinase et de BLSE. Ce résultat confirme les propriétés antibactériennes de *T. superba* en référence aux données ethnopharmacologiques de la littérature [4; 5 ; 44; 2]. Nous avons donc

effectué une évaluation quantitative plus précise (CMI) de cette action inhibitrice d'extraits totaux ou spécifiques de différents organes de *T. superba* sur les deux souches de *E. coli* productrices respectivement de pénicillinase et de BLSE.

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. Le meilleur rendement est obtenu pour les extraits coumariniques (15 %). Cette famille de composés chimiques de *T. superba* serait-elle le meilleur inhibiteur de la croissance des souches de *E. coli* ?

L'étude comparative 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 deux souches de *E. coli*, productrices respectivement de pénicillinase et de BLSE (CMI = 1mg/mL). Les CMI relativement plus élevées obtenues pour les extraits spécifiques d'écorces de *T. superba* témoignent d'un pouvoir inhibiteur atténué aussi bien chez les dérivés coumariniques (CMI = 4 mg/mL), anthracéniques (CMI = 6 mg/mL et 5 mg/mL), taniques (CMI = 6 mg/mL et 5 mg/mL) que chez les mucilages (CMI > 10 mg/mL). On pourrait évoquer ici, une action probable partiellement dénaturante des solvants utilisés pour l'extraction de ces dérivés, ou une absence d'effet synergique entre ces dérivés se trouvant hors des extraits totaux éthanoliques d'écorces. Par ailleurs de ces résultats on en déduit que l'activité antibactérienne de *Terminalia superba* sur les souches de *E. coli* est due à une synergie d'action entre les coumarines, les dérivés anthracéniques et les tanins.

4.2 Etude de quelques propriétés biochimiques des β lactamases

Au cours de nos déterminations par spectrophotométrie d'absorption moléculaire dans le visible, la longueur d'onde de 578 nm utilisée pour la mesure

de l'activité β -lactamase est la longueur d'onde d'absorption optimale du rouge de phénol (phénolsulfonephtaléine) définie dans notre laboratoire au début de nos travaux de recherche.

ZENZO et coll [60] au cours d'une étude portant sur les propriétés physico-chimiques de la phénolsulfonephtaléine et de la phénolphtaléine ont déterminé par balayage spectral la longueur d'onde permettant d'avoir une DO maximale. Cette longueur d'onde (591nm) est très proche de celle que nous avons retenue.

A 578nm, 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. Seul le complexe coloré rouge a une absorbance significative à 578 nm. Ceci traduit une bonne spécificité de la mesure de l'activité de la β -lactamase à 578 nm.

Un autre élément important dans notre étude est la détermination de l'unité enzymatique. Nos résultats sont confortés par certaines données de la littérature.

MORIS- VARAS et coll [42] 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.

ZHAO et coll [61] ont conclu lors du dosage spectrophotométrique d'un antibiotique (la roxithromycine) qu'il y avait dans le mécanisme réactionnel, le transfert d'une charge d'une molécule de roxithromycine à une molécule de rouge de crésol.

Enfin YU et coll [58] 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 mole de

proton H^+ /min. On peut admettre par conséquent que la réaction d'hydrolyse de la Benzylpénicilline couplée au transfert du proton sur le rouge de phénol se déroule mole à mole. Ces considérations viennent en appui à la définition que nous avons donnée de l'unité enzymatique de la β -lactamase.

La détermination des profils isoenzymatiques de la pénicillinase et de la BLSE par chromatofocalisation, implique l'évaluation de la cinétique enzymatique ($\Delta DO/ \text{min}$) dans les différents tubes d'élution. Cette évaluation ne pourrait se faire dans le visible par la méthode acidimétrique de SYRE puisque les fractions éluées sont susceptibles d'avoir des pH différents au cours de l'élution chromatographique. Pour cette étape, les lectures spectrophotométriques ont été faites dans l'UV.

Au préalable, le spectre d'absorption du substrat Benzylpénicilline (Benzylpénicilline à 200 $\mu\text{g/ml}$ en tampon phosphate pH 7,0 10mM) présente un maximum d'absorption à 220 nm. Par ailleurs, la Benzylpénicilline présente une absorbance significative à 240 nm.

AMRAM [7] a montré qu'en UV, la Benzylpénicilline et son produit d'hydrolyse, l'acide pénicilloïque présentaient un maximum d'absorption à 210 nm mais qu'ils avaient 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 β -lactamase en UV. Ceci justifie le choix de la longueur d'onde de 240 nm pour la mesure des absorbances lors de la chromatofocalisation. Par chromatofocalisation, la pénicillinase et la BLSE de *E.coli* présentent respectivement des pHi de 5,4 et 6,4

Phillipon et coll. [50] ont déterminé par électrofocalisation les pHi des β -lactamases des différents phénotypes de résistance des entérobactéries. Les pénicillinases présentent des pHi qui varient de 5,4 à 5,6 alors que les β -lactamases à spectre élargi ont des pHi variant de 6,3 à 7,6.

Nos résultats obtenus par chromatofocalisation confirment ces propriétés caractéristiques de la pénicillinase et de la BLSE. Par ailleurs, ces deux β -lactamases ont été éluées en un seul pic bien individualisé ; ceci suggère que les deux souches de *E. coli* étudiées ne renferment respectivement qu'un seul type de pénicillinase et un seul type de BLSE. Cela nous autorise, à poursuivre l'étude des propriétés cinétiques sur les extraits bruts de la β -lactamase.

Au regard du profil protéique obtenu dans les deux cas (Figures 10 et 11) nous pouvons remarquer que l'étape de la chromatofocalisation a permis d'isoler significativement l'activité pénicillinase et BLSE.

Les K_m obtenus pour les activités BLSE et pénicillinase sur la Benzylpénicilline lors de notre étude (6250 $\mu\text{mol/L}$ et 32787 $\mu\text{mol/L}$ respectivement), traduisent une plus grande affinité de la BLSE pour la Benzylpénicilline.

BERMUDES et coll [13] ont également isolé une BLSE- IRT d'une souche de *Klebsiella oxytoca* qui présentait un K_m de 18000 $\mu\text{mol/L}$ pour la Benzylpénicilline, donc une affinité moindre pour la pénicilline que notre souche de *E.coli* productrice de BLSE- IRT.

De plus, la BLSE présente une V_{max} (3,49 $\mu\text{mol/L/min}$) plus élevée que celle de la pénicillinase ($V_{max} = 0,99 \mu\text{mol/L/min}$). Cette activité catalytique élevée de la BLSE comparée à la pénicillinase vient confirmer les résultats obtenus lors de la mise en évidence de la présence de BLSE ou de la pénicillinase dans les souches de *E. coli* (réaction positive en 15 minutes pour la souche productrice de BLSE et après 60 minutes pour la souche productrice de pénicillinase).

L'étude de la thermostabilité de la pénicillinase et de la BLSE, montre que ces deux hydrolases sont peu thermostables. Elles doivent par conséquent être conservées dans des conditions strictes, à des températures basses (-20°C) ou sous forme lyophilisée.

Les pourcentages d'inhibition par les extraits totaux éthanoliques d'écorces de *Terminalia superba* (à la concentration de 2 mg/mL) sur la pénicillinase et la BLSE extraites de *E. coli* (respectivement 65 et 81 %) sont relativement élevés.

Cet extrait recèlerait donc au moins un inhibiteur de la β -lactamase. Cet inhibiteur semble avoir une plus grande affinité pour la BLSE que la pénicillinase. La synthèse de la BLSE résulte souvent d'une modification intervenue au niveau du site actif d'une pénicillinase préexistante [15] ; et à notre connaissance aucune corrélation n'a été formellement établie entre le spectre de résistance aux β -lactamines et le niveau de résistance aux inhibiteurs de β -lactamase.

En nous inspirant du mécanisme d'action des β -lactamines [11 ; 21] sur les entérobactéries, nous pourrions suggérer que l'action des molécules actives d'extraits de *T. superba* sur les souches de *E. coli* productrices de BLSE et de pénicillinase se déroule en deux étapes successives qui sont :

- l'action d'un inhibiteur de β -lactamase qui inhiberait l'activité de la pénicillinase et de la BLSE.
- l'action de substances apparentées aux β -lactamines, susceptibles d'inhiber la synthèse de la paroi de *E. coli*.

Enfin, il faut remarquer que l'inhibiteur de β -lactamase des extraits totaux d'écorces de *T. superba* est réellement actif sur la BLSE de *E. coli*, à l'opposé de l'acide clavulanique, habituellement incorporé dans les produits pharmaceutiques antibiotiques commercialisés.

Conclusion & recommandations

Nos résultats confirment les propriétés antibactériennes de *T.superba* à travers celles des extraits totaux éthanoliques et précisent une approche de son mécanisme d'action antibiotique qui reviendrait à une inhibition préalable de la β -lactamase secrétée par *E. coli* suivie d'une action antibiotique *stricto sensu*. Cette action antibiotique consisterait à l'instar de celle des β -lactamines à une inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne. Néanmoins, nous n'excluons pas l'hypothèse d'un mécanisme de résistance plus complexe qui intégrerait également l'imperméabilité de la paroi bactérienne aux antibiotiques ou la présence au sein de la bactérie de protéines liant la pénicilline (PLP) modifiées.

L'étude des propriétés physico-chimiques et cinétiques de la BLSE et de la pénicillinase extraites de *E. coli* a permis de mettre en évidence quelques différences fondamentales entre ces deux enzymes notamment leur affinité et leur activité catalytique vis-à-vis d'un substrat (la Benzylpénicilline) et leur pHi.

Enfin, il faut souligner un acquis important à l'issue de cette étude, c'est l'identification et la mise en évidence d'un inhibiteur de β -lactamase au sein d'une espèce végétale africaine : *Terminalia superba*. Cet inhibiteur pourrait être proposé comme alternative en industrie pharmaceutique pour résoudre le problème crucial et sans cesse accru de la multirésistance des germes aux inhibiteurs de β -lactamases et aux antibiotiques commercialisés en général.

Cette étude doit être poursuivie par la purification, l'évaluation du pH optimum, de la température optimale, ainsi que la détermination de la masse moléculaire et de la structure moléculaire. De plus, la détermination des caractéristiques génétiques de ces deux enzymes (résistance chromosomique ou plasmidique) permettra d'évaluer l'aptitude des deux souches de *E. coli* à transmettre la résistance à des souches jusque-là sensibles.

En ce qui concerne l'étude phytochimique nous envisageons :

- l'isolement et l'identification des principes actifs de *T. superba* responsables de cette action inhibitrice synergique.
- l'exploration des propriétés antimicrobiennes de *T. superba* sur d'autres souches bactériennes (staphylocoques, streptocoques) ainsi que sur des parasites.
- l'étude des effets pharmacologiques et toxiques de ce principe actif ainsi que la définition des formes galéniques et des modes d'administration les plus adaptés à la santé des utilisateurs.

A l'issue de nos travaux, nous recommandons :

➤ **Au Ministère de la Santé et au Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique :**

- De promouvoir l'intégration de la pharmacopée africaine dans notre système de santé en collaboration avec les organisations spécialisées (OMS, ONUDI, UNICEF etc.)
- De prendre des dispositions au niveau des hôpitaux pour faciliter les essais cliniques des médicaments à base de plantes de la pharmacopée africaine (les phytomédicaments).
- D'envisager l'opportunité d'intégrer la pharmacopée traditionnelle dans la formation médicale.
- De renforcer les actions des groupes de recherche et d'information sur la pharmacopée et l'environnement.
- De favoriser, avec les Etats de la sous-région Ouest-Africaine, la création d'un centre interafricain de recherche sur les plantes de la pharmacopée.

➤ **Aux chercheurs**

- D'intensifier le recensement des plantes à vertus thérapeutiques et d'encourager les études phytosanitaires
- D'harmoniser les protocoles de méthodologie et d'étude des plantes de la pharmacopée.
- D'approfondir les études au laboratoire de biologie médicale (notamment en bactériologie) pour une maîtrise des mécanismes et des phénotypes de résistance des principales souches bactériennes rencontrées .

Références

1. **ANDERSON D M W, BELL PHILP C.**
Composition and properties of the gum exudates from *Terminalia serica* and *Terminalia superba*. Dep. Chim. Univ. Edinburgh; Edinburgh UK. Phytochemistry 1974 ; **13** : 1871 – 4.
2. **ADEWUMI CO, AGBEDAHUNSI JM, ADEBAJO AC, ALADESANMI AJ, MURPHY WANDO J.**
Ethno-veterinary medicine: screening of Nigeria medicinal plants for Trypanocidal properties. J Ethnopharmacol 2001 ; **77**: 19-24.
3. **ADJANOHOON E J, ADJAKIDE V, AHYI M R A, AKE ASSI E, AKOEGNINO A, d'ALMEIDA J, et al.**
Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques en République Populaire du Bénin. Paris: ACCT, 1989; 609 p.
4. **ADJANOHOON E J, AKE ASSI E, FLORET T, GUINKO S, KOUMARE M, AHYI A M R, et al.**
Médecine traditionnelle et pharmacopée, contribution aux études ethnobotaniques et floristiques du Mali. Paris: ACCT, 1979; 206 p.
5. **ADJANOHOON E J, AKE ASSI E, FLORET T, GUINKO S, KOUMARE M, AHYI A M R, et al.**
Médecine traditionnelle et pharmacopée, contribution aux études ethnobotaniques et floristiques du Mali. Paris: ACCT, 1980; 245 p.
6. **AKOEGNINO A, VAN DER B, VAN DER M.**
Flore analytique du Bénin. Wageningen : Wageningen University Papers, 2006; 877 p.
7. **AMRAM S.**
A direct spectrophotometric Assay and Determination of Michaelis Constants for the β -lactamase Reaction. Anal Biochem 1975; **63** : 17 - 26.
8. **ATTA-UR R, ZAREEN S, IQBAL C M.**
Terminalia A. a novel triterpenoid from *Terminalia glaucescens*. Tetrahedron Letters 2006; **43**: 6233-6.

9. **AVRIL J L, DABERNAT H, DENIS F, MONTEIL H.**
Bactériologie clinique, 2^{ème} édition. Paris: Ellipses, 1989; 602 p.
10. **BATERSON D L, YU V L.**
Extended spectrum bêtalactamases: a call for improved detection and control. Clin Infect Dis 1999; **29** : 1419-22.
11. **BERCHE P.** Le conflit hôte – bactérie. In: **BERCHE P, GAILLARD J L, SIMONET M,** eds. Bactériologie: les bactéries des infections humaines. Paris: Flammarion, 1988; 9 – 34.
12. **BERHAUT J.**
Flore illustrée du Sénégal, Tome II. Sainte Ruffine : Maisonneuve , 1974; 430 p.
13. **BERMUDES H, JUDE F, CHAIBI E B , ARPIN C, BEBEAR C, LABIA R, AND QUENTIN C.**
Molecular characterization of TEM-59 (IRT-17), a Novel Inhibitor Resistant TEM-Derived β -lactamase in clinical isolate of *Klebsiella oxytoca*. Antimicrob Agent Chemother 1999; **43**: 1657- 61.
14. **BERNARD S.**
Biochimie clinique. Paris : Maloine, 1985 ; 385 p.
15. **BRADFORD P A.**
Extended-spectrum betalactamase in the 21st century: characterization, epidemiology and detection of the important resistant threat. Clin Microbiol Rev 2001 ; 933 – 51.
16. **BRISSON A N, TRIEU-CUOT P, SOUGAKOFF W, COURVALIN P.**
Aspects actuels de la résistance bactérienne aux antibiotiques. Ann Biol Clin 1989 ; **47** : 98-101.
17. **BRUNETON J.**
Pharmacognosie, Phytochimie – Plantes Médicinales. Paris : Tech & Doc, 1989 ; 600 p.

18. **BUJDAKOVA H.**
Study of betalactam resistance in ceftazidime-resistant clinical isolate of Enterobacteriaceae. J. Antimicrob Agents 1998 ; **2**: 135-41
19. **BURKILL H M.**
The useful Plants of West Tropical Africa. Richmond, Royal Botanic Gardens Kew 1985, **1**: 777 p.
20. **CARBONNELLE B, DENIS F, MARMONIER A, PINON G, VARGUES R.**
Bactériologie médicale ; Techniques usuelles. Paris: Simep, 1987; 289 p.
21. **COURVALLIN P, GOLDJSEIN F, PHILIPPON A, SIROT J.**
L'antibiogramme. Paris: Mpc-Vidéon, 1985 ; 265 p.
22. **COWAN M J**
Plants products as antimicrobial agents. Clin Microbiol rev 1989; **17**: 564-658.
23. **CRONQUIST A.**
An integrated system of classification flowering plants. New York: Colombia University press, 1981; 187 p.
24. **DECOSTER A.**
Entérobactéries.
Consulté le 25/02/2007 00 :41 :20 GMT
<http://anne.decoستر.free.fr/bgn/enterob.htm>
25. **DECOSTER A, LEMAHIEU J C, DEHECQ E, GONTIER P, DUHAMEL M.**
Résistances aux antibiotiques.
Consulté le 11/03/2007 02 :05 :48 GMT
<http://anne.decoستر.free.fr/atb/resab.htm>
26. **DIMOT T, LAURENT F, ROKONIRINA S V, TAN P V, KAMTCHOUING P, DONGO E, et al.**
Methanol extract of *Terminalia superba* induces endothelium-independent

relaxation of rat thoracic aorta. Yaounde Cameroon pharmacie 2006;**61**: 470-3

27. **DOAT J.**
Bois et Forêts des Tropiques. Venez: Div Cell Chim-Tech Forestier Trop, 1978; 231 p.
28. **DUVAL J, SOUSSY C J.**
Antibiothérapie. Paris: Masson, 1990; 188 p.
29. **FERRON A.**
Bactériologie Médicale. La Madeleine: C et R, 1992; 572 p.
30. **FRERE J M, GERDAY C.**
Les méthodes de purification et d'analyse des protéines. Paris: Masson, 1981; 435 p.
31. **GUTMANN L, WILLIAMSON R.**
Les résistances aux bêta-lactamines. Paris: Flammarion, 1987; 512 p.
32. **HYLE EP, LIPWORTH AD, ZAOUTIS TE, MACHAAMKIN I, FISHMAN NO, BILER WB, et al.**
Risk factors for increasing multidrug resistance among extended –Spectrum β -lactamase. Clin Infect Dis 2005, **40**: 1317-24
33. **IBANEZ M C, FERRERO C.**
Extraction and Characterization of the hydrocolloid from *Prosopis flexuosa* DC. Seeds. Food Research International 2003; **36**: 455 – 60.
34. **JARLIER V.** Entérobactéries et β -lactamines. In: COURVALIN P, GOLDSTEIN F, PHILIPPON A, SIROT J, eds. L'antibiogramme. Gembloux: J. Duculot, 1988; 263-269.
35. **KABORE Z I, GUISSOU I P, SOURABIE S, GNAGOA G.**
Eléments de monographie sur *Nucléa natifolia* SM. *Rubiaceae* : chimie,

Activités biologiques, Toxicité. Pharma Méd Tra Afri 1998; **10** : 42-54.

36. **KABORE Z I, GUISSOU I P, SOURABIE S, GNAGOA G.**
Etude antibactérienne in vitro d'extraits alcaloïdiques de *Holarrhena floribunda*, vis-à-vis de *Escherichia coli* entéropathogène sérotype O₁₂₇.
Pharma Méd Tra Afri 1998; **10**: 13-26.
37. **KAMTCHOUING P, KAHPUI S M, DZEUFET D P D, TEDONG L, ASONGALEM E A, DIMO T.**
Antidiabetic activity of methanol/methylen chloride stem bark extracts of *Terminalia superba* and *Canarium schweinfurthii* on streptozotocin induced diabetic rats. J ethnopharmacol 2006; **104**: 306- 9.
38. **KHAC D D, TRAN-VAN S, CAMPOS A M, LALLEMAND J, FETIZON Y.** Ellagic compounds from *Diplopanax Stachanthus*.
Phytochemistry 1990; **29**: 251- 6.
39. **KRUH J.**
Biochimie (Etudes médicales et biologiques). Paris: Hermann, 1971; 236 p.
40. **LEHNINGER A.**
Principles of biochemistry. New-York: work published, 2000; 265 p.
41. **MOITTIE D.**
Les entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre élargi ; détection, distribution, épidémiologie et attitudes thérapeutiques. Paris: Option / Bio, 1988; 167 p.
42. **MORIS- VARAS F, SHAH A, AIKENS J, NADKARNI NP, ROZZEL JD, DEMIRJIAN DC.**
Visualization of enzyme-catalyzed reactions using pH indicators: rapid screening of hydrolase libraries and estimation of the enantioselectivity.
Bioorg Med Chem 1999; **7**: 2183-8.
43. **National Committee for Clinical Laboratory Standard.**
Performances standards for antimicrobial susceptibility testing; ninth information. Pensylvania: Standard M, 1999; 100 – 59.

44. **NEUWINGER H D.**
African Traditional Medicine: a dictionary of plant use and applications. Stuttgart: Med Pharm-Scientific-Publisher, 2000; 254 p.
45. **OTEO J, LAZARO E, de ABAJO FJ, FAQUERO F, CAMPOS I.**
Antimicrobial-resistant invasive *Escherichia coli*. Emerg Infect Dis, 2005; **11** : 546-53.
46. **PEIFFER B.**
Gastro-entérites dues à *Escherichia coli* : Archives de la liste d'hygiène
Modifié le 13/11/05
<http://www.liste-hygiène.org/ESCHE.html>
47. **PERCHERON F, PERLES R, FOGLIETTI M J.**
Abrégé de biochimie générale I (Bioénergétique, Protides, Enzymologie, Acides nucléiques). Paris : Masson, 1985 ; 452 p.
48. **PETER J, HOUGHTON AMALA RAMAN.**
Laboratory handbook for the fractionation of Natural Extracts. Chapman & Hall 1998; **1**: 1-199.
49. **PHILIPPON A.**
 β -lactamases : Généralités
Nouvelle version du 10.12.05
<http://www.chu-rouen.fr/ssf/prod/betalactamase.html>
50. **PHILIPPON A, PAUL G, NEVOT P.**
Bêta-lactamases : Incidence et intérêt clinique. Rean Soins intens Med urg 1987; **3** : 229 – 34.
51. **ROY O.**
Les β -lactamases. Paris: option / Bio, 1988 ; 187 p.
52. **SEFTON A M.**
The impact of the resistance on the management of urinary tracts. Int J

antimicrob Agents 2000; **13**: 489-91.

53. **De SOUZA C, KOUMAGLO K, GBEASSOR M.**
Evaluation des propriétés antimicrobiennes des extraits aqueux totaux de quelques plantes médicinales. *Pharma Méd Tra Afr* 1995 ; **10**: 103-12.
54. **STRYER L.**
Biochemistry. New-York: Freeman and company, 2002; 527 p.
55. **SYRE R B.**
Methods for detecting bêtalactamase. Livingstone: D S Reeves I Phillips J D Williams R Wise, 1981; 246 p.
56. **TANAKA T, JIANG Z H, KOUNO I.**
Distribution of ellagic acid derivatives and a diarylheptanoid in wood of *Platycarya strobilacea*. *Phytochemistry* 1998; **47**: 851- 4.
57. **WAGNER H, BLADT S.**
Plant Drug Analysis. Munick: Springer, 1996; 854 p.
58. **WU TZ, HSUCH PR, CHANG LY, YANG CY, SHAO PL, PILEE CYLEE, et al.**
Infections of Cefotaxime-resistant and Cefmetazole-susceptible *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in children. *J Microbiol Immunol Infect* 2005; **38**:112 – 6.
59. **YU Z, PAN J, ZHOU HM.**
A direct continuous pH-spectrophotometric assay for arginine kinase activity. *Protein Pept Lett* 2002; **9**: 545-52.
60. **ZENZO T, RINEE T, KENNICHI O, NASAKO M.**
Features of Phenol Sulfonylphthalein and phenolphthalein substituted at all orthoposition of phenols with bromine. *Analytical Sciences* 1999; **15**: 339.
61. **ZHAO GZ, LI HK.**
Spectrophotometry determination of roxithromycin based on charge transfer reaction. *Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi* 2003; **23**: 157- 9.

TABLES DES MATIERES

LISTE DES ENSEIGNANTS.....	I
DEDICACES.....	IV
REMERCIEMENTS.....	VIII
TABLEAUX ET FIGURES.....	XII
ABREVIATIONS ET SIGLES.....	XIV
SOMMAIRE.....	XVIII
INTRODUCTION.....	1
1. GENERALITES.....	3
1.1 Données ethnobotaniques, ethnopharmacologiques et chimiques sur <i>Terminalia superba</i>	4
1.1.1. Description botanique et répartition géographique.....	4
1.1.2. Usages thérapeutiques.....	5
1.1.3. Composition chimique.....	6
1.2. Quelques espèces végétales de la pharmacopée africaine utilisées au cours des infections et parasitoses.....	8
1.3. Propriétés biologiques et pharmacologiques de quelques composés Phytochimiques.....	10
1.3.1. Les alcaloïdes.....	10
1.3.2. Les anthocyanes.....	10
1.3.3. Les anthracénosides.....	10
1.3.4. Les coumarines.....	11
1.3.5. Les flavonoïdes	11
1.3.6. Les saponosides.....	11
1.3.7. Les tanins et polyphénols.....	12
1.3.8. Les triterpènes et stéroïdes.....	12
1.3.9. Les hétérosides cardiotoniques.....	12
1.4. <i>Escherichia coli</i>	13
1.4.1- Historique.....	13
1.4.2- Définition.....	13

1.4.3.- Habitat.....	13
1.4.4- Pathogénie.....	14
1.4.5- Isolement et culture.....	15
1.4.6- Caractères biochimiques.....	16
1.5- Bêtalactamines.....	16
1.5.1- Structure chimique et composition des β -lactamines.....	17
1.5.2. Mécanisme d'action des β -lactamines.....	20
1.6- Résistance des BGN aux antibiotiques.....	21
1.6.1- Les enzymes inactivant les antibiotiques.....	22
1.6.1.1- Les enzymes inactivant les β -lactamines : les β -lactamases.....	22
1.6.1.2- Les enzymes inactivant les aminosides.....	28
1.6.1.3- Les enzymes inactivant les phénicolés.....	28
1.6.2- Autres mécanismes	28
1.7- Méthodes de détermination des β -lactamases au laboratoire.....	31
1.7.1- Méthodes spectrophotométriques	31
1.7.2- Méthodes microbiologiques	31
1.8- Méthodes courantes d'extraction et de Purification des enzymes....	32
1.8.1- Extraction des protéines	33
1.8.2- Purification	33
1.8.2.1- Isolement de l'ensemble des protéines.....	33
1.8.2.2- fractionnement proprement dit du mélange protéique.....	33
a - Méthodes chromatographiques sur colonne.....	33
b- Méthodes non chromatographiques	35
1.9- Caractérisation des enzymes	36
1.9.1 Propriétés cinétiques	36
1.9.1.1. Détermination de l'activité catalytique d'une enzyme.....	36
1.9.1.2- Vitesse maximale (V_{max}).....	37
1.9.1.3- Constante de Michaelis Menten (K_m)	37
1.9.2- Propriétés physico-chimiques	38
2- CADRE, MATERIEL ET METHODE.....	39
2.1. Cadre.....	40
2.2. Matériel et réactifs.....	40
2.2.1. Matériel biologique.....	40
2.2.2 Réactifs.....	41

2.3. Méthodes.....	42
2. 3. 1. Etude phytochimique qualitative.....	42
2. 3. 1. 1. Mise en évidence des dérivés quinoniques : réaction de Born-trager	43
2. 3. 1. 2. Mise en évidence des saponosides.....	43
2.3. 1. 3. Mise en évidence des stéroïdes et triterpènes.....	43
2.3. 1. 4. Mise en évidence des composés réducteurs.....	45
2.3. 1. 5. Mise en évidence des mucilages.....	45
2.3. 1. 6. Mise en évidence des composés polyphénoliques.....	46
2.3. 1. 7. Mise en évidence des dérivés cyanogénétiques.....	48
2.3. 1. 8. Mise en évidence des dérivés anthracéniques.....	49
2.3. 1. 9. Mise en évidence des coumarines.....	50
2.3. 1. 10. Mise en évidence des alcaloïdes.....	50
2.3. 2. Analyse chromatographique sur couche mince (CCM).....	52
2.3. 2. 1. Principe.....	52
2.3. 2. 2. Préparation des échantillons.....	52
2.3.2.3. Dépôt et migration des échantillons.....	53
2.3. 2. 4. Identification des substances.....	54
2.3. 3. Extraits totaux.....	55
2.3. 3. 1. Extraits totaux éthanoliques.....	55
2.3. 3. 2. Extraits totaux méthanoliques.....	55
2.3. 3. 3. Extraits totaux aqueux.....	56
2.3. 4. Extractions par polarité croissante de solvants.....	56
2.3. 5. Extractions spécifiques.....	57
2.3. 5. 1. Extraction spécifique des dérivés anthracéniques.....	57
2.3. 5. 2. Extraction spécifique des coumarines.....	57
2.3. 5. 3. Extraction spécifique des tanins.....	58
2.3.5. 4. Extraction spécifique des mucilages.....	59
2.3.6- Etude bactériologique.....	59
2.3.6.1- Identification et conservation des souches de <i>E.coli</i>	59
2.3.6.2- Détection de la β -lactamase en milieu liquide	60
2.3.6.3. Test d'inhibition de la croissance des souches de <i>E. Coli</i>	62
2.3.6.4. Concentration minimale inhibitrice (CMI) des extraits végétaux sur les souches de <i>E. Coli</i> productrices de β -lactamases	63
a. Préparation de la gamme de dilutions des extraits végétaux.....	63

b. Détermination des CMI des extraits végétaux.....	64
2.3.7- Etude biochimique	65
2.3.7.1- Extraction de la pénicillinase et de la BLSE de <i>E.coli</i>	65
2.3.7.2- Détermination de l'activité pénicillinase et BLSE par Spectrophotométrie d'absorption moléculaire dans le visible...	66
a- Principe	66
b- Cinétique enzymatique de la pénicillinase et de la BLSE dans le visible.....	68
c- Détermination de l'unité enzymatique.....	69
2.3.7.3- Méthodes spectrophotométriques en UV.....	70
a- Détermination de la longueur d'onde d'absorption optimale.....	70
b- Cinétique enzymatique dans l'UV	70
2.3.7.4- Méthode chromatographique: chromatofocalisation.....	71
2.3.7.5- Détermination de la constante de michaelis menten (Km) et de la vitesse maximale (Vmax).....	71
2.3.7.6- Etude de la thermostabilité de la pénicillinase et de la BLSE	72
2.3.7.7- Action des inhibiteurs sur la pénicillinase et la BLSE.....	73
2.3.7.8- Détermination du pourcentage d'inhibition.....	73
3. RESULTATS.....	75
3.1. Criblage phytochimique de <i>Terminalia superba</i>	76
3.2. Analyse chromatographique sur couche mince.....	77
3.3. Différentes extractions.....	78
3.3.1. Extraits totaux.....	79
3.3.2. Extractions par polarités croissantes de solvants.....	79
3.3.3. Extraits spécifiques.....	80
3.4. Etude bactériologique.....	80
3.4.1- Identification de deux souches de <i>E. Coli</i> productrices de pénicillinase et BLSE et détermination de leurs phénotypes de résistance.....	80
3.4.2- Mise en évidence de la production de β -lactamase par les souches de <i>E.coli</i>	82
3.4.3. Test d'inhibition de la croissance des souches de <i>E. Coli</i> par les extraits totaux éthanoliques.....	83
3.4.4. Concentration minimale inhibitrice (CMI) des extraits végétaux sur les souches de <i>E. Coli</i> productrices de β -lactamases.....	83

3.4.4.1. Extraits totaux.....	83
3.4.4.2. Extraits par polarités croissantes de solvants.....	84
3.4.4.3. Extraits spécifiques.....	85
3.5 Etudes biochimiques.....	85
3.5.1- Extraction de la pénicillinase et de la BLSE de <i>E.coli</i>	85
3.5.2- Détermination de l'activité pénicillinase et BLSE par spectrophotométrie d'absorption moléculaire dans le visible.....	86
3.5.2.1- Droite d'étalonnage du substrat-réactif au rouge de phénol dans le visible.....	86
3.5.2.2- Etude de la cinétique enzymatique de la pénicillinase et de la BLSE dans le visible	88
3.5.3- Longueur d'onde d'absorption optimale de la Benzylpénicilline à 200 µg/mL dans l'ultrat- violet (UV)	90
3.5.4- Droite d'étalonnage du substrat benzylpénicilline dans l'UV ...	91
3.5.5- Profil d'élution de la pénicillinase et de la BLSE par chromatofocalisation	93
3.5.6- Détermination des K_m et V_{max} de la pénicillinase et de la BLSE...	95
3.5.7- Etude de la thermostabilité de la pénicillinase et de la BLSE...	97
3.5.8- Inhibition de la pénicillinase et de la BLSE de <i>E. Coli</i> par <i>Terminalia superba</i>	99
4- DISCUSSION.....	100
4.1 Action inhibitrice d'extraits de <i>Terminalia superba</i> sur des souches de <i>Escherichia coli</i> productrices de β -lactamases.....	101
4.2 Etude de quelques propriétés biochimiques des β -lactamases.....	105
CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS.....	110
REFERENCES.....	114

ANNEXES

ANNEXE I : Réactifs

1. Réactif de STIASNY

- Formol à 30 % : 2 volumes
- Hcl concentré : 1 volume

2. Réactif de SHINODA

- Alcool éthylique 50 % : 2 volumes
- Acide chlorhydrique concentré : 1 volume

3. Réactif de FEHLING (mélange extemporané des FEHLING A et B 1 :1)

* FEHLING A

- Sulfate de cuivre ($\text{CuSO}_4, 5 \text{H}_2\text{O}$) : 35 g
- Acide sulfurique : 5 mL
- Eau distillée QSP : 100 mL

* FEHLING B

- Tartrate double de sodium et potassium : 150 g
- Soude en pastilles : 135 g
- Eau distillée QSP : 100 mL

Chauffer le mélange pendant 10 min au bain – marie bouillant

4. Réactif de MAYER

- Chlorure de mercure à 22,66 g/L : 120 mL
- Iodure de potassium à 250 g/L : 40 mL
- Eau distillée : 60 mL

5. Ether chloroformique

- Ether : 2 volumes
- Chloroforme : 1 volume

6. Réactif de DRAGENDORFF (mélange des solutions A, B et C)

* Solution A

- Nitrate basique de bismuth : 0,85 g
- Acide acétique glacial : 10 mL
- Eau distillée : 40 mL

* Solution B

- Iodure de potassium : 8 g
- Eau distillée : 20 mL

* Solution C

- Acide acétique glacial : 20 mL
- Eau distillée : 80 mL

7. Anhydride acétique – acide sulfurique

- Anhydride acétique : 50 volumes
- Acide sulfurique : 1 volume

8. Solution alcoolique de méthanitrobenzène à 1 %

- Méthanitrobenzène : 1 volume
- Alcool : 100 volumes

9. Solution alcoolique d'acide dinitrobenzoïque 2 %

- Acide dinitrobenzoïque : 2 volumes
- Alcool : 100 volumes

10. Tampon de lyse

Dissoudre dans 100mL d'eau distillée :

- KH_2PO_4 130 mg
- Na_2HPO_4 358mg

- EDTA 86 mg
- Ajouter 0,6 mL de Triton X 100 et homogénéiser.
Ajuster le pH à 8,0 avec une solution de NaOH 1N et stériliser.

11. Rouge de Phénol à 0,3%

Dissoudre 30mg de rouge de phénol dans 10mL d'éthanol à 95° et homogénéiser. La solution se conserve à 4°C dans un flacon brun.

12. Substrat- réactif au Rouge de phénol

- Benzylpénicilline (1.000.000 UI) 0,6g
- Eau distillée stérile 460µL
- NaOH 1N stérile 240µL
- Rouge de phénol 0,3% 300µL

Le réactif se conserve 24h à 4°C.

13. Tampon phosphate 10mM pH 7

- KH₂PO₄ 0,68g
- Eau distillée 350mL

Ajouter du NaOH 0,1N jusqu'à pH 7,0 et compléter à 500mL avec de l'eau distillée.

14. Solution de substrat benzylpénicilline

Préparer une solution-mère du substrat benzylpénicilline à 200mg/mL en faisant dissoudre 600mg de benzylpénicilline dans 3mL du Tampon phosphate 10mM pH7.

Réaliser ensuite une dilution au 1/3000^{ème} de la solution ainsi préparée. On obtient une solution à 200µg/mL.

15. Tampon imidazole 25mM ; HCl pH 7,4 ; Triton X 100 0,1%

Dissoudre 0,85g d'imidazole dans 200mL d'eau distillée. Ajouter 0,5mL de Triton X 100 et homogénéiser.

Ajuster le pH à 7,4 avec une solution de HCl 1N ou 0,1N. Compléter à 500mL avec de l'eau distillée.

16. Solution de NaOH 1 N

- NaOH 4g
- Eau distillée 100mL

17. PB 74, HCl pH 3,8 ; Triton X 100 0,1%

A 20mL de PB 74, ajouter 80mL d'eau distillée puis 0,2 mL de Triton X 100 et homogénéiser.

Ajuster le pH à 3,8 avec une solution de HCl 0,1N ou 1N. Compléter à 200mL avec de l'eau distillée.

18. Solution de HCl 1N

Verser 9mL de HCl pur dans 91mL d'eau distillée.

19. Solution de HCl 0,1 N

Prélever 10mL de HCl 1N et les verser dans 90mL d'eau distillée.

ANNEXE II : *Terminalia superba*



Terminalia superba



Terminalia superba (feuilles)



Terminalia superba : écorces



Terminalia superba : racines

ANNEXE III : Certificat d'authenticité



Abomey - Calavi le, 30 juillet 2007

CERTIFICAT D'IDENTIFICATION

Le Responsable de l'Herbier National du Bénin, soussigné, certifie que la plante récoltée par Mlle LOKO Armelle Mylène, du Laboratoire CIRSAR, dans le cadre de leurs travaux de recherche est identifiée sous :

Numéro : AA 6304 / HNB
Nom scientifique : *Terminalia superba* Engl. & Diels
Famille : Combretaceae

En foi de quoi, le présent certificat lui est délivré pour servir et valoir ce que de droit.

Le Responsable,

Professeur Akpovi AKOEGNINOU.

Université d'Abomey-Calavi, Faculté des Sciences et Techniques
Département de Biologie Végétale 01 B.P. 4521 Cotonou (Rep. du Bénin)
Tél. (229) 36 00 74 / 36 01 28 poste 333 • Fax (229) 30 - 55 - 50

SERMENT DE GALIEN

Je jure en présence des maîtres de la faculté des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples .

** D'honorer ceux qui m'ont instruite dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;*

** D'exercer dans l'intérêt de la Santé Publique ma profession, avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;*

** De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.*

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couverte d'opprobre et méprisée de mes confrères si j'y manque.

Je le jure !

RESUME

Terminalia superba Engl. et Diels (Combretaceae) est une espèce végétale couramment utilisée en médecine traditionnelle pour le traitement de diverses maladies infectieuses (buccopharyngées, intestinales, broncho-pulmonaires etc). Des dérivés anthracéniques, coumariniques, taniques et des mucilages ont été identifiés dans ses organes (écorces, feuilles et racines) par criblage phytochimique. La présence de dérivés anthracéniques et coumariniques a été confirmée par chromatographie sur couche mince. Une extraction spécifique de ces familles phytochimiques a été également entreprise.

De tous ces extraits obtenus, les extraits totaux éthanoliques ont les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) les plus basses sur deux souches de *E. coli* productrices de pénicillinase et de β -lactamase à spectre élargi (BLSE) (CMI = 1mg/mL).

La BLSE et la pénicillinase extraites de *E. coli* présentent respectivement des Km de 6250 $\mu\text{mol/L}$ et 32787 $\mu\text{mol/L}$ et des Vmax de 3,49 $\mu\text{mol/L/min}$ et 0,99 $\mu\text{mol/L/min}$ pour la Benzylpénicilline. Cette activité catalytique relativement élevée de la BLSE est corrélée avec la rapidité de la réaction d'hydrolyse de l'antibiotique en milieu liquide par la souche de *E. coli* productrice de BLSE.

Par chromatofocalisation, la BLSE et la pénicillinase focalisent chacune en un seul pic bien défini à des pHi respectifs de 6,4 et 5,4.

Il s'agit donc d'entités moléculaires bien individualisées. La BSLE et la pénicillinase sont inhibées par les extraits totaux éthanoliques d'écorces de *Terminalia superba* à 81% et 65% respectivement.

Nous pouvons en déduire une approche du mécanisme d'action antibiotique des extraits d'organes de *Terminalia superba* qui consisterait en une inhibition de la β -lactamase de *E. coli*, en préalable à une perturbation de la synthèse de la paroi bactérienne, à l'instar des β -lactamines.

Mots clés

β -lactamase
Escherichia coli
Inhibiteur de β -lactamase
Terminalia superba
Concentration Minimale Inhibitrice
Antibiotiques

ABSTRACT

Terminalia superba Engl. and Diels (Combretaceae) is used in traditional medicine in Africa for the treatment of various infections (eg. Oropharyngitis and intestinal or lung diseases). Coumarins, anthracens, tannins and gum polysaccharides compounds were identified in stem barks, roots and leaves by screening. Coumarins and anthracens were confirmed by thin layer chromatography.

Ethanollic extracts of stem barks of *T. superba* showed the lowest inhibitory activity on the growth of extended spectrum β -lactamase (ESBL) and penicillinase *E. coli*.

ESBL and penicillinase were extracted from *E. coli*. Their Km values were 6250 $\mu\text{mol/L}$ and 32787 $\mu\text{mol/L}$ respectively; Vmax values were 3,49 $\mu\text{mol/L/min}$ versus 0,99 $\mu\text{mol/L/min}$.

By chromatofocusing ESBL and penicillinase exhibited pHi 6,4 and pHi 5,4 respectively.

ESBL and penicillinase extracted from *E. coli* are inhibited by ethanolic stem barks extracts up to 81 per cent and 65 per cent respectively. Then, *T. superba* seems to afford some compounds involved in ESBL and penicillinase inhibitory whereas another compounds, following the example of β -lactams, are responsible for bacterial membrane synthesis failure.

Key words

β -lactamase
Escherichia coli
 β -lactamase inhibitor
Terminalia superba
Minimal Inhibitory Concentration
Antibiotics

-----Disciplines-----

Pharmacognosie – Bactériologie – Biochimie clinique

FICHE SIGNALÉTIQUE

NOM : LOKO

PRENOMS : ARMELLE MYLENE

TITRE DE LA THESE : Action inhibitrice d'extraits de *Terminalia superba* sur des souches de *Escherichia coli* productrices de β -lactamases ; propriétés biochimiques des β -lactamases.

VILLE DE SOUTENANCE : BAMAKO

LIEU DE DEPOT : Bibliothèque de la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto-stomatologie.

SECTEUR D'INTERET : MEDECINE TRADITIONNELLE

RESUME

Terminalia superba Engl. et Diels (Combretaceae) est une espèce végétale couramment utilisée en médecine traditionnelle pour le traitement de diverses maladies infectieuses (buccopharyngées, intestinales, broncho-pulmonaires etc). Des dérivés anthracéniques, coumariniques, taniques et des mucilages ont été identifiés dans ses organes (écorces, feuilles et racines) par criblage phytochimique. La présence de dérivés anthracéniques et coumariniques a été confirmée par chromatographie sur couche mince. Une extraction spécifique de ces familles phytochimiques a été également entreprise.

De tous ces extraits obtenus, les extraits totaux éthanoliques ont les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) les plus basses sur deux souches de *E. coli* productrices de pénicillinase et de β -lactamase à spectre élargi (BLSE) (CMI = 1mg/mL).

La BLSE et la pénicillinase extraites de *E. coli* présentent respectivement des Km de 6250 μ mol/L et 32787 μ mol/L et des Vmax de 3,49 μ mol/L/min et 0,99 μ mol/L/min pour la Benzylpénicilline. Cette activité catalytique relativement élevée de la BLSE est corrélée avec la rapidité de la réaction d'hydrolyse de l'antibiotique en milieu liquide par la souche de *E. coli* productrice de BLSE.

Par chromatofocalisation, la BLSE et la pénicillinase focalisent chacune en un seul pic bien défini à des pHi respectifs de 6,4 et 5,4.

Il s'agit donc d'entités moléculaires bien individualisées. La BLSE et la pénicillinase sont inhibées par les extraits totaux éthanoliques d'écorces de *Terminalia superba* à 81% et 65% respectivement.

Nous pouvons en déduire une approche du mécanisme d'action antibiotique des extraits d'organes de *Terminalia superba* qui consisterait en une inhibition de la β -lactamase de *E. coli*, en préalable à une perturbation de la synthèse de la paroi bactérienne, à l'instar des β -lactamines.

Mots clés

β -lactamase

Escherichia coli

Inhibiteur de β -lactamase

Terminalia superba

Concentration Minimale Inhibitrice

