



CENTRE D'INGENIERIE DES PROTEINES



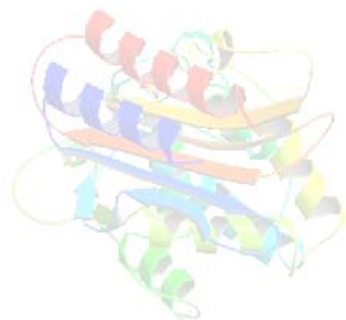
***CARACTÉRISATION DES BETA-LACTAMASES ET LEUR
INHIBITION PAR LES EXTRAITS DE PLANTES
MÉDICINALES***



Thèse

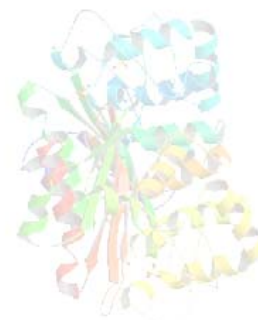


**Présentée en vue de l'obtention du diplôme
de Doctorat ès Sciences
en Biochimie**



Par

Joseph GANGOUE PIEBOJI
Docteur de 3^{ème} Cycle



Sous la Direction de

Jean-Marie FRERE
Professeur ordinaire

Novembre 2007



TABLE DE MATIÈRE

	Page
Dédicace	i
Remerciements	ii
Liste des figures	iv
Liste des tableaux	v
Liste des abréviations	vi
Résumé	vii
Abstract	x
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I REVUE DE LA LITTERATURE	5
I.1. Paroi bactérienne	5
I.2. Protéines-Liant-Pénicilline	9
I.3. Inhibition des PLPs	10
I.4. Mécanismes de résistance aux β-lactamines	12
I.4.1. Résistance par production des β -lactamases	12
I.4.2. β -lactamases à spectre élargi	15
I.4.2.1. Généralités	15
I.4.2.2. Détection	16
I.4.2.2.1. Techniques microbiologiques	17
I.4.2.2.2. Les techniques moléculaires	20
I.4.2.3. Diversité des types de BLSE	20
I.4.2.4. Epidémiologie des BLSE	22
I.5. Inhibition des β-lactamases et résistances aux inhibiteurs	24
I.6. Les plantes en Médecine	28
I.7. Les plantes étudiées	31
I.7.1 <i>Bridelia micrantha</i> (Hochsh) Baill	31
I.7.2. <i>Garcinia lucida</i> Vesque (Clusiaceae)	33
CHAPITRE II. MATERIEL ET METHODES	35
II.1. Souches bactériennes	35
II.2. Sensibilité aux antibiotiques et détection des BLSE	36
II.3. Caractérisation des souches productrices des BLSE	37

II.3.1. Transfert de gène de résistance	37
II.3.1.1. Expérience de conjugaison	37
II.3.1.2. Expérience de transformation	38
II.3.1.2.1. Préparation de cellules compétentes	39
II.3.1.2.2. Transformation de cellules compétentes	39
II.3.2. Extraction des β -lactamases	39
II.3.3. Isoélectrofocalisation	40
II.3.4. Hydrolyse des β -lactamines par les extraits bruts de BLSE	41
II. 3.5. Extraction des ADN	41
II.3.6. Détection et amplification du gène BLSE	42
II.3.7. Electrophorèse en gel d'agarose	43
II.3.8. Séquençage des gènes BLSEs	44
II.3.9. Préparation des sondes d'ADN	44
II.3.10. Contenu des plasmides et hybridation	45
II.3.11. ERIC-PCR	47
II.3.12. Numéros d'accèsion des séquences	47
II.4. Recherche d'ihnibiteurs des β-lactamases dans les plantes médicinales	47
II.4. 1. Récolte des plantes	47
II.4.2. Extraction des plantes	48
II.4.3. Enzymes	48
II.4.3. Elimination des tannins des extraits de plantes	48
II.4.4. Activité inhibitrice des extraits de plante sur les β -lactamases	48
II.4.5. Chromatographie Liquide Haute Performance	49
II.4.5.1. Chromatographie liquide haute performance analytique	49
II.4.5.2. Chromatographie liquide haute performance préparative	51
II.5. Traitement des données	51
CHAPITRE III. RÉSULTATS	52
III.1. Souches Bactériennes	52
III.2. Sensibilité aux antibiotiques	52
III.3. Détection des BLSE	53
III.4. Transfert de résistance, analyse des plasmides et Hybridation	54
III.5. Caractérisation des BLSE	60
III.5.1. Hydrolyse des β -lactamines par les β -lactamases à spectre élargi	60
III.5.2. Points isoélectriques	60

III.5.3. Détection du gène codant pour la production des BLSE	61
III.5.4. Séquençage des gènes <i>bla</i>	62
III.5.5. Environnement génétique du gène <i>bla</i>CTX-M-15	63
III.6. Epidémiologie moléculaire des souches productrices de CTX-M-15	64
III.7. Activité des extraits et produits purs des plantes sur les β-lactamases	65
III.7.1. Activité inhibitrice des extraits bruts	65
III.7.2. Activité inhibitrice des produits purs des extraits de <i>G. lucida</i> et <i>B. micrantha</i>	68
III.7.2.1. <i>Garcinia lucida</i>	68
III.7.2.2. <i>Bridelia micrantha</i>	71
CHAPITRE IV DISCUSSION	74
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	81
REFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	83
ANNEXE	101
Annexe A. Listes des publications	101
Annexe B. Schémas de classification des β -lactamases des bactéries	102
Annexe C. Comparaison des séquence nucléotidiques de <i>bla</i> _{SHV-1} (Query) et <i>bla</i> _{SHV-12} (Sbjct)	103
Annexe D. Comparaison des séquence nucléotidiques de <i>bla</i> _{SHV-12} original (SHV-5a) (Query) et <i>bla</i> _{SHV-12} du Cameroun (Sbjct)	104
Annexe E. Tirés à part des publications	105

DÉDICACE

*À mon épouse **Mbomda Zepang Ida Francine** pour son affection, son soutien et tous les sacrifices consentis tout le long de ce travail.*

*A mes enfants **Gangoué Gadeu Krystal** et **Gangoué Zévang Daryl** que ce travail soit pour vous un exemple à suivre.*

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé dans les laboratoires :

- de Bactériologie de l'Hôpital Central de Yaoundé (HCY) où les souches bactériennes ont été isolées, identifiées et leur sensibilité aux antibiotiques déterminée ;
- de Microbiologie de l'Institut de Microbiologie de Zurich (Suisse), de l'Institut Pasteur d'Athènes et du Medical School d'Athènes (Grèce) où les souches productrices de β -lactamases ont été caractérisées.
- du Centre d'Ingénierie des Protéines (CIP) (Liège, Belgique) où la recherche des inhibiteurs des β -lactamases dans les plantes médicinales a été effectuée.

Je voudrais exprimer ma profonde gratitude à :

l'Agence Universitaire de la Francophonie qui m'a permis de séjourner en Belgique et de réaliser une partie de ce travail en m'octroyant une bourse ;

la Fondation de Bourses du Gouvernement Grecque (IKY) qui a financé mon séjour en Grèce.

Monsieur le Professeur P. Ngassam, je vous suis reconnaissant pour avoir accepté de diriger cette recherche. Vos conseils, vos encouragements m'ont permis de surmonter les difficultés rencontrées au cours de la réalisation de ce travail.

Madame le Professeur S. Koulla-Shiro, je tiens à vous exprimer ma profonde gratitude pour la confiance que vous m'avez témoignée au cours de la réalisation de la première partie de ce travail.

Messieurs les membres du jury, recevez mes plus vifs remerciements pour avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie également :

Professeur J.M. Frère, Directeur du CIP qui m'a accueilli dans son centre et a mis à ma disposition tout le matériel nécessaire pour la recherche des inhibiteurs des β -lactamases ;

Professeur M. Galleni du CIP qui a suivi de très près la réalisation de ce travail, pour sa disponibilité sans limite et pour tous ses conseils,

Professeur L. Tzouvelekis de l'Institut Pasteur d'Athènes et du Medical School d'Athènes (Grèce) et Professeur H. Hächler du laboratoire de Microbiologie de l'Institut de Microbiologie de Zurich (Suisse), pour leur franche collaboration dans la caractérisation des souches productrices de β -lactamases à spectre élargi ;

Docteurs A. Dubus et C. Généreux qui m'ont aidé dans le fractionnement des composés par chromatographie liquide haute performance;

Messieurs S. Baurin et F. Giacomeli pour leur disponibilité et leur aide dans les différentes manipulations ;

Professeur L Angenot et Docteur M. Tits du laboratoire de pharmacognosie de la Faculté de Médecine de l'Université de Liège (ULG) (Belgique) pour leurs nombreux conseils ;

Professeur A. Luxen et toute son équipe du Centre Cyclotron (ULG) pour leur contribution dans la détermination de la structure chimique des inhibiteurs ;

tous les chercheurs et membres du personnel du CIP, tous les membres du laboratoire de bactériologie du Centre Pasteur d'Athènes et tout le personnel du laboratoire de bactériologie de l'HCY, pour leur accueil, leur assistance, leur disponibilité, leur aimable et efficace collaboration ;

mon épouse pour son affection, les sacrifices consentis et pour son soutien sans faille ;

mes parents, pour leur tendresse qui m'ont permis de braver les vicissitudes inhérentes à la vie et pour tous les sacrifices consentis à mon endroit ;

tous mes frères et sœurs pour leur soutien sans faille ;

mes amis et collègues, pour leur soutien, leur aide, et pour l'ambiance studieuse, fraternelle et sympathique qui a toujours régné entre nous ;

tous les enseignants du laboratoire de Biologie Générale de la Faculté des Science de l'Université de Yaoundé I (Cameroun) pour leur disponibilité et leur conseil qui ont été d'un apport scientifique indéniable dans la réalisation de ce travail ;

Tous ceux qui de près ou de loin m'ont aidé et encouragé au cours de la réalisation de ce travail.

Liste des figures

	Pages
Figure 1 :	Paroi des bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif 5
Figure 2 :	Schéma de la structure primaire du peptidoglycane bactérien 7
Figure 3 :	Biosynthèse du peptidoglycane 8
Figure 4 :	Structure de quelques β -lactamines 11
Figure 5 :	Voie catalytique générale des β -lactamases à sérine active 13
Figure 6 :	Structure des β -lactamines et analogues du stade de transition qui ont une activité inhibitrice sur les β -lactamases à sérine active 26
Figure 7 :	Proposition de mécanisme d'inactivation des β -lactamases de la classe A par l'acide clavulanique 28
Figure 8 :	Structure des composés antimicrobiens des plantes..... 30
Figure 9 :	<i>Bridelia micrantha</i> (arbre, feuilles, fruits) 32
Figure 10 :	<i>Garcinia lucida</i> Vesque Feuilles (a), fruits (b) et graine (c) 34
Figure 11 :	Disposition des disques d'antibiotique pour le test de double synergie 37
Figure 12 :	(a) Profils de restriction par <i>PstI</i> des plasmides extraits des souches produisant la BLSE CTX-M-15 59
	(b) Hybridation du <i>bla_{CTX-M}</i> par les sondes spécifiques 59
Figure 13 :	Gel d'agarose des produits des PCR de SHV avant (A) et après (B) la digestion par <i>NheI</i> 61
Figure 14 :	Gel d'agarose des produits PCR de <i>bla_{CTX-M}</i> 62
Figure 15 :	Représentation schématique des séquences <i>ISEcp1-bla_{CTX-M-15}</i> dans les plasmides pYC-5b (A) et pYC-14 (B) 64
Figure 16 :	Gel d'agarose des produits de ERIC-PCR des souches cliniques productrices de la BLSE CTX-M. 65
Figure 17 :	Activité résiduelle (%) des β -lactamases vis-à-vis des plantes médicinales 66
Figure 18 :	Activité résiduelle de P99 vs <i>G. lucida</i> 66
Figure 19 :	Variation de Vi/Vo de P99 en fonction de la concentration de l'extrait <i>G. lucida</i> 67
Figure 20 :	Activité résiduelle de OXA-10 vs extrait de <i>B. micrantha</i> 67
Figure 21 :	Variation de Vi/Vo de OXA-10 en fonction de la concentration de l'extrait de <i>B. micrantha</i> 68
Figure 22A :	Chromatogramme extrait brut de <i>G. lucida</i> 69
Figure 22B :	Chromatogramme extrait de <i>G. lucida</i> dépourvu de tanin 69
Figure 23 :	Activité résiduelle de P99 vs produit 4 de <i>G. lucida</i> 70
Figure 24 :	Variation de Vi/Vo de P99 en fonction de la concentration du produit 4 (<i>G. lucida</i>) 70
Figure 25 :	Activité résiduelle de P99 vs produit 2 (<i>G. lucida</i>) 71
Figure 26A :	Chromatogramme extrait brut de <i>B. micrantha</i> 72
Figure 26B :	Chromatogramme extrait de <i>B. micrantha</i> dépourvu de tanin 72
Figure 27 :	Variation de Vi/Vo en fonction de la concentration des produits purs de <i>B. micrantha</i> 73
Figure 28 :	Comparaison des séquences nucléotidiques de <i>bla_{SHV-1}</i> de Bradford (2001) (<i>SHV-1Bra</i>) et <i>bla_{SHV-12}</i> du Cameroun (<i>SHV-12Ca</i>). 103
Figure 29 :	Comparaison des séquence nucléotidiques de <i>bla_{SHV-12}</i> du Cameroun (<i>SHV-12Ca</i>) et <i>bla_{SHV-12}</i> original (<i>SHV-12Or</i>) 104

Liste des tableaux

	Page
Tableau 1 : Comparaison des points critiques nationaux des antibiotiques pour les Entérobactéries	16
Tableau 2 : Traitement recommandé pour les infections causées par des souches productrices de BLSE	24
Tableau 3 : Classe majeure de composés antimicrobiens des plantes et mécanisme d'action	31
Tableau 4 : Souches cliniques étudiées	35
Tableau 5 : Caractéristiques des autres souches utilisées	36
Tableau 6 : Protocoles de PCR suivant le type de gène	43
Tableau 7 : Amorces utilisées dans cette étude	46
Tableau 8 : Gradient de réalisation de HPLC	50
Tableau 9 : Répartition des souches cliniques par produits pathologiques	52
Tableau 10 : Sensibilité des souches isolées entre 1995-1998 aux antibiotiques.	53
Tableau 11 : Prévalence du phénotype BLSE parmi les membres de la famille des Entérobactéries isolés de 1995-1998.	54
Table 12 : Répartition des Entérobactéries présentant le phénotype BLSE par service hospitalier, produits pathologiques et sensibilité aux antibiotiques et points isoélectriques des différentes enzymes produites	56
Tableau 13 : Caractéristiques des souches transconjugantes, transformantes et de la souche clinique <i>E. coli</i> YC-2	58
Tableau 14 : Activité résiduelle de OXA-10 vs produits purs de <i>B. micrantha</i>	73
Tableau 15 : Schémas de classification des β -lactamases des bactéries	102

Liste des abréviations

AMC: amoxicilline/acide clavulanique
Amk: amikacine
Amx: amoxicilline
bla: beta-lactamase
BLAST : “Basic Local Alignment Search Tool”
BLSE : β -lactames à spectre élargi
bp : “Base pair”
CAZ: ceftazidime
Cfz: céfazoline
CHR: Chirurgie
CI₅₀ : Concentration Inhibant 50% de l’activité de l’enzyme
CIP : Centre d’Ingénierie de Protéines
Cip: cirpofloxacin
CLSI : “Clinical Laboratory Standards Institute”
CMI: Concentration minimale inhibitrice
CRO: ceftriaxone
CTAB : hexadécyltriméthylammonium bromide
Ctx: céfotaxime
CTX-M : céfotaximase
DA : diamino
EDTA: Ethylenediamine tetraacetic acid
ERIC : “Enterobacterial Repetitive Consensus”
Fox: céfoxitine
GES : Guiana extended spectrum beta-lactamase
GlcNAc : N-acétylglucosamine
Gm: gentamicine
GO: Gynécologie/Obstétrique
HCY : Hôpital Central de Yaoundé
HPLC: “High Performance Liquid Chromatography”
IMP: Imipénase
Imp: imipénème
Kb : kilobase
mm : millimètre
mn : minutes
MurNac : N-acétylmuramique
NCBI : National Center for Biotechnology Information
NCCLS : “National Committee of Clinical Laboratory Standards”
Nor: norfloxacin
Ofx : ofloxacin
OXA: Oxacilline
PCR : “Polymérase Chain Reaction”
pI : Point Isoélectrique
Pip: piperacilline
PLP : Protéine Liant Pénicilline
SDS : Sodium Dodécyl Sulfate
SHV : Sulphydryl variable
SI: Soins Intensifs
SIDA : Syndrome d’Immunodéficience Acquise
Sxt: triméthoprime/sulfaméthoxazole
TE: Tris EDTA
TEA: Tris-EDTA-Acétate
TEM : Témoin
URO: Urologie
VEB: Vietnamese extended spectrum beta-lactamase
VIH: Virus de l’Immunodéficience Humaine

RÉSUMÉ

Les bactéries productrices de β -lactamase à spectre élargi (BLSE) ont été rapportées dans plusieurs pays, mais aucune information n'est disponible sur les différents types de BLSE produits par les Entérobactéries au Cameroun. On distingue plus de 290 types de β -lactamases divisés en 4 classes (A, B, C, et D) et jusqu'aujourd'hui il n'existe pas des inhibiteurs capables d'inhibés toutes les classes de β -lactamase.

Un total de 267 souches d'Entérobactéries a été isolé entre 1995-1998 (259 souches) et 2002 (8 souches) des produits pathologiques (urines, pus et sang) des patients hospitalisés dans divers services de l'Hôpital Central de Yaoundé. L'étude de la sensibilité *in vitro* de ces bactéries à 12 antibiotiques (amoxicilline, amoxicilline/acide clavulanique, pipéracilline, imipénème, céfazoline, céfoxitine, céfotaxime, ceftazidime, aztréonam, gentamicine, ofloxacine et triméthoprime/sulfaméthoxazole) par la méthode des disques a permis de noter un certains nombre de faits : l'imipénème, l'ofloxacine et la ceftazidime sont les antibiotiques les plus actifs sur les différentes Entérobactéries avec respectivement 100%, 91% et 88% de bactéries sensibles ; les différentes souches présentent un niveau de résistance élevé à l'amoxicilline (90%), à la pipéracilline (79%), à la céfazoline (75%) et au triméthoprime/sulfaméthoxazole (74%).

En vue de détecter les espèces bactériennes productrices de BLSE, 69 souches résistantes à au moins une céphalosporine de 3^{ème} génération ou au monobactame ont été soumises au test de double synergie. Trente-huit (31 entre 1995-1998 ; 7 en 2002) souches ont montré un test positif. La prévalence des souches productrices de BLSE est de 12% (31/259). Ces souches présentant un phénotype BLSE sont observées chez toutes les espèces d'Entérobactéries étudiées avec une prévalence de 18,8% (*Klebsiella* spp.), de 17,6% (*Citrobacter* spp.), de 14,3% (*E. coli*) et de 1,8% (*Proteus* spp.).

Parmi les 38 souches potentiellement productrices de BLSE, 18 (47,4%) ont transféré le gène de résistance des oxyimino-céphalosporines aux souches *E. coli* HK 225, K12 et DH5 α . Seize de ces gènes ont été transférés par conjugaison et deux par transformation. Le transfert de gène de BLSE a été co-transféré avec le gène de résistance à la gentamicine et/ou au triméthoprime/sulfaméthoxazole. Toutes les souches transconjugantes et transformantes ont présenté un phénotype BLSE et ont été toutes sensibles à la céfoxitine et à l'imipénème.

Les extraits enzymatiques bruts obtenus par sonication des souches transconjugantes, transformantes et cliniques ont été capable de réduire les diamètres d'inhibition autour des disques de pénicillines, céphalosporines 1^{ère} à la 3^{ème} génération ou monobactame en utilisant

une souche d'*E. coli* complètement sensible aux antibiotiques, mais n'ont pas eu d'effet sur ces zones autour des disques d'imipénème, de céfoxitine et d'amoxicilline/acide clavulanique. La détermination des points isoélectriques (pIs) des différentes souches après transfert du gène de résistance par la technique d'isoélectrofocalisation a montré que les souches transconjugantes et transformantes produisent des β -lactamases dont les pIs varient de 5,4 à 8,8. En effet, 12 souches produisent les BLSE de pI 8,2 ; deux souches en plus de cette BLSE produisent deux autres enzymes de pIs 5,4 et 8,5. Les souches de phénotypes CTX-M produisent soit une enzyme (pI 8,4 ; une souche) soit deux (pIs 7,3, 8,8 ; 2 souches) ou alors 3 types (pIs 5,4 ; 7,3 et 8,8 ; une souche).

Les extraits d'ADN de 19 souches (16 transconjugantes, 2 transformantes et 1 souche clinique) soumis à la technique de PCR, PCR/*NheI*, en utilisant les amorces spécifiques des gènes *bla_{SHV}*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{TEM}* et *bla_{OXA}* ont montré que les différents extraits contiennent les gènes des β -lactamases du type SHV (sulfhydryl variable), CTX-M (cefotaximase), TEM (Temoniera) et OXA (aoxacillinase). L'analyse de la séquence des différents produits de PCR a permis de montrer que : 14 souches produisent la BLSE SHV-12, cinq la BLSE CTX-M (CTX-M-1, une souche ; CTX-M-15, 4 souches) ; quatre souches produisent en association avec les BLSE les β -lactamases TEM-1 (SHV-12, 2 souches ; CTX-M-15, 2 souches) OXA-30 (CTX-M-15, 4 souches). L'analyse des profils de digestion des plasmides portant les gènes *bla_{CTX-M}* par les enzymes de restriction, d'hybridation et des profils génotypiques des souches cliniques productrice de ces enzymes par ERIC-PCR a montré que la dissémination de la BLSE CTX-M peut se faire soit par transfert de plasmide (on retrouve le même plasmide chez deux souches différentes, *E. coli* YC-14 et *K. pneumoniae* YC-17) soit par la même souche d'un patient à un autre (*E. coli* YC-5 = *E. coli* YC-2). L'étude de l'environnement génétique de ce gène (*bla_{CTX-M-15}*) par l'analyse des séquences a montré que CTX-M-15 est codée par deux plasmides multirésistants différents, parmi lesquels un (pYC-5b) porte l'élément *ISEcp1-bla_{CTX-M-15}* flanqué par un site de répllication constituée de 5 paires de bases et inséré dans le transposon Tn2. Une forme tronquée de cet élément a été identifiée chez l'autre plasmide (pYC-14). Les BLSE SHV-12, CTX-M-1 et CTX-M-15 sont décrites pour la première fois au Cameroun.

Dans le but de rechercher de nouveaux inhibiteurs des β -lactamases plus actifs, nous avons étudié deux plantes médicinales, *Garcinia lucida* (Clusiaceae) et *Bridelia micrantha* (Euphorbiceae) en vue d'évaluer leur activité anti- β -lactamase. Les concentrations inhibant 50 % de l'activité de l'enzyme (CI₅₀) des extraits de *G. lucida* et *B. micrantha* sont

respectivement de 0,01 mg/ml (β -lactamase P99) et de 0,019 mg/ml (β -lactamase OXA-10) indiquant ainsi une bonne inhibition des β -lactamases par les extraits de ces plantes. Le produit 4 issu de la purification par chromatographie haute performance de l'extrait de *G. lucida* est très actif sur la β -lactamase P99 ($CI_{50} = 0,038$ mg/ml) alors que les produits 2' et 3' provenant de l'extrait de *B. micrantha* sont actifs sur l'enzyme OXA-10 (CI_{50} de 0,09 mg/ml et 0,11 mg/ml respectivement). La détermination de la structure des composés actifs de ces deux plantes pourrait être une voie importante dans le développement des inhibiteurs des β -lactamases.

Mots clés : antibiotiques, β -lactamase, β -lactamase à spectre élargi, Entérobactéries, inhibiteur de β -lactamase, CTX-M, SHV-12, *Garcinia lucida*, *Bridelia micrantha*, plantes médicinales.

ABSTRACT

Bacteria producing extended-spectrum β -lactamase (ESBL) have been reported in many countries, but there is no information on different type of ESBL-producing enterobacteria in Cameroon. More than 290 β -lactamases have been described and divided into four classes (A, B, C and D) and up to now, there is no good inhibitor which can inhibit all classes of β -lactamases.

A total of 267 strains of Enterobacteriaceae were isolated between 1995-1998 (259 isolates) and 2002 (eight isolates) from pathological products (urines, pus and blood) of patients at the Yaounde Central Hospital. The susceptibility of the isolates to 12 antibiotics (amoxicillin, amoxicillin/clavulanate, piperacillin, imipenem, cefazolin, cefoxitin, cefotaxime, ceftazidime, aztreonam, gentamicin, ofloxacin and trimethoprim/sulfamethoxazole) was determined using the agar diffusion disk method. Imipenem, ofloxacin and ceftazidime were the most active antibiotics against overall enterobacteria with susceptibility rates of 100%, 91% and 88% respectively. High resistance rates were observed to amoxicillin (90%), piperacillin (79%), cefazolin (75%) and trimethoprim/sulfamethoxazole (73%).

Enterobacteria isolates (69) resistant to oxyimino-cephalosporin or monobactam were screened for ESBL production by the double disk (DD) synergy test. Thirty-eight (31 from 1995-1998; seven in 2002) were proved positive to the DD synergy test, suggesting the presence of ESBL. The prevalence of ESBL was 12% (31/259) and ESBL-producing strains were *Klebsiella* spp. (18.8%), *Citrobacter* spp. (17.6%), *Escherichia coli* (14.3%) and *Proteus* spp. (1.8%).

Of the 38 ESBL-producing strains, 18 (47.4%) were transferred resistance to oxyimino-cephalosporins to *E. coli* HK 225, K12 and DH5 α . Sixteen of these strains were transferred ESBL gene by conjugation and two by transformation. Resistance to gentamicin and/or trimethoprim/sulfamethoxazole was co-transferred. All transconjugant and transformant strains exhibited ESBL phenotype but remained susceptible to cefoxitin and imipenem.

Crude extracts of β -lactamase-producing transconjugants, transformants and clinical strains were able to reduce the diameters of inhibition zones around disks containing penicillins, 1st to 3rd generation cephalosporins or monobactam when tested against a fully susceptible *E. coli* strains, but had no effect on such zones around cefoxitin-, imipenem- and amoxicillin/clavulanate disks. The determination of isoelectric points (pIs) of the various strains after transfer of resistance determinant showed that transconjugants and transformants

strains produced β -lactamases with pIs 5.4 to 8.8. In fact, 12 strains produced β -lactamase with pI 8.2, 2 strains in addition to the above enzyme produced two others enzymes with pIs 5.4 and 8.5. Strains with CTX-M- phenotype produced enzyme (pI 8.4, 1 strain), two (pIs 7.3, 8.8; 2 strains) or three types pIs (5.4, 7.3, 8.8; 1 strain).

PCR, PCR/*NheI* was performed using total or plasmid DNA from 19 strains as templates, and the primers specific to *bla_{SHV}*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{TEM}* and *bla_{OXA}*. Direct sequencing of PCR products revealed that: 14 strains produced SHV-12 ESBL, 5 CTX-M- ESBL (CTX-M-1, one strain; CTX-M-15, 4 strains); four other strains shared non-ESBL TEM-1 (2 producing-SHV-12 strains and 2 producing-CTX-M-strains) and OXA-30 (4 producing CTX-M-15 strains).

Analysis of restriction patterns of plasmid carrying *bla_{CTX-M}* gene, hybridization, and genotyping patterns of CTX-M-clinical strains by ERIC-PCR showed that dissemination of *bla_{CTX-M}* gene could be done by plasmid transfer (same plasmid in different strains, *E. coli* YC-14 and *K. pneumoniae* YC-17) or by strains from patient to patient (same strain, *E. coli* YC-2=*E. coli* YC-5). Sequence analysis of genetic environment of *bla_{CTX-M-15}* revealed that CTXM-15 was encoded by two different multiresistant plasmids, of which one (pYC-5b) carried an *ISEcpI-bla_{CTX-m-15}* element flanked by five bp target site duplication and inserted within a Tn2-derived sequence. A truncated form of this element in the second plasmid (pYC-14) was identified. ESBLs SHV-12, CTX-M-1, CTX-M-15 are described for the first time in Cameroon.

In our effort to find new active β -lactamase inhibitors, we investigated two medicinal plants, *Garcinia lucida* (Clusiaceae) and *Bridelia micrantha* (Euphorbiaceae) for anti- β -lactamase activity. The extracts from *G. lucida* and *B. micrantha* exhibited good inhibition of β -lactamase P99 (IC₅₀, 0.01 mg/ml) and OXA-10 (IC₅₀, 0.02 mg/ml) respectively. Purified products from these plants by high performance liquid chromatography showed that, product 4 from *G. lucida* is very active on β -lactamase P99 (IC₅₀, 0.03 mg/ml) whereas products 2' and 3' from *B. micrantha* are active on OXA-10 (IC₅₀, 0.09 mg/ml; 0.11 mg/ml respectively). The structural elucidation of the active constituents of these plants will provide useful leads in the development of β -lactamase inhibitors.

Key words: antibiotic, β -lactamase inhibitor, β -lactamase, extended-spectrum- β -lactamase, Enterobacteriaceae, CTX-M, SHV-12, *Garcinia lucida*, *Bridelia micrantha*, medicinal plants.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les maladies infectieuses sont responsables de 45 % des décès dans les pays à faibles revenus et de presque une mortalité prématurée sur deux dans le monde entier. Les infections bactériennes représentent 70 % des cas de mortalité causés par les microorganismes (Walsh, 2003). Selon le National Institute of Health, les maladies infectieuses représentent la seconde cause de décès et la première cause de perte d'années de vie productives à travers le monde (Fauci, 2001).

Les β -lactamines représentent la principale famille d'antibiotiques la plus développée et la plus utilisée dans le monde. Cette large utilisation est due à leur large spectre d'action, leur faible toxicité, leur efficacité et à leur faible coût pour certaines molécules (Livermore, 1995).

Les bactéries ont développé différents mécanismes pour contrecarrer l'action des β -lactamines, entre autre la modification de la cible (Protéines liants Pénicillines) qui les rend moins sensibles aux β -lactamines mais permet de maintenir son activité physiologique normale ; la synthèse des enzymes (β -lactamases) qui inactivent les β -lactamines par modification chimique ; l'acquisition ou la surproduction des pompes efflux qui peuvent expulser l'antibiotique hors de la cellule même contre le gradient de concentration et la modification des porines chez les bactérie à Gram-négatif, ayant pour résultat la diffusion plus lente des β -lactamines à travers la membrane externe (Galleni *et al.*, 1995 ; Nikaido, 1998 ; Lakaye *et al.*, 1999 ; Walsh, 2003).

Les β -lactamases catalysent de manière efficace et irréversible l'hydrolyse de la liaison amide du cycle β -lactame des antibiotiques de la famille des β -lactamines, donnant un produit biologiquement inactif qui perd totalement son activité antimicrobienne (Matagne *et al.*, 1998). Les gènes qui codent pour ces enzymes sont d'origine chromosomique ou plasmidique. Ces gènes ont aussi été détectés sur des transposons et des integrons facilitant ainsi le transfert horizontal de ces deniers entre espèces phylogénétiquement éloignées. Ces enzymes sont exportés dans le milieu extracellulaire (bactéries à Gram positif) ou périplasmique (bactéries à Gram négatif). La production des β -lactamases est le mécanisme de résistance le plus répandu et le plus important des bactéries vis-à-vis des β -lactamines (Livermore, 1995). Plus de 290 types de β -lactamases sont décrits (www.lahey.org/studies/inc_webt.html) et classés suivant leur structure primaire en 4 classes (A-D) (Ambler, 1980). La plus grande partie des β -lactamases a été mise en évidence chez les

bacilles à Gram négatif qui sont par ailleurs responsables de la majorité des infections hospitalières (60%) et sont de plus en plus multirésistants (Bergone-Berezin *et al.*, 1993 ; Bush, 1995 ; Archibald *et al.*, 1997). La dissémination des β -lactamases communes et l'apparition de nouveaux enzymes ou d'enzymes mutants sont reliées directement à l'utilisation abusive des β -lactamines dans le domaine de la santé humaine et animale et en agriculture (Kunin *et al.*, 1990 ; Witte, 1997 ; Normark and Normark, 2002).

Les β -lactamases à spectre élargi (BLSE) constituent un groupe d'enzymes qui ont la propriété commune de conférer la résistance aux pénicillines, à la 1^{ère}, 2^{nde}, 3^{ème} et 4^{ème} génération de céphalosporines, à l'aztréoname (mais non aux céphamycines et carbapénème) par hydrolyse de ces antibiotiques, et qui sont inhibées par les inhibiteurs des β -lactamases tel l'acide clavulanique (Bush *et al.*, 1995). La présence des BLSE a été décrite pour la première fois chez *Klebsiella ozaeniae*, en 1983 en République Fédérale d'Allemagne, puis en 1984 chez *K. pneumoniae* et *E. coli* en France et en Tunisie (Kliebe *et al.*, 1985 ; Knothe *et al.*, 1983).

Des travaux portant sur la production des BLSE par les Entérobactéries en Afrique ont été limités en Afrique saharienne. Des données sur l'Afrique sub-saharienne sont rares et éparées. Ainsi, des travaux ont rapporté la présence des BLSE dans les pays de l'Afrique du Nord, au Mali, au Sénégal, au Nigeria, au Cameroun, en Ethiopie, au Kenya, en Tanzanie et en Afrique du sud (Paterson & Bonomo, 2005 ; Seid & Astral ; 2005 ; Pitout *et al.*, 1988 ; Gangoué Piéboji, 2000 ; Weil *et al.*, 2004).

L'acquisition des données sur la résistance bactérienne aux antibiotiques est nécessaire pour une meilleure prise en charge thérapeutique des infections et pour élaborer une stratégie de contrôle de la résistance antimicrobienne. La lutte contre la résistance aux β -lactamines peut se faire suivant plusieurs approches entre autre, l'utilisation des antibiotiques non β -lactamines et des β -lactamines stables aux β -lactamases. L'approche thérapeutique la plus utilisée en clinique est l'utilisation de la combinaison des inhibiteurs suicides (acide clavulanique, sulbactame et tazobactame) des β -lactamases avec les pénicillines. Ces combinaisons inhibent la croissance des bactéries produisant les β -lactamases de la classe A de Ambler (1980) tels les enzymes du type TEM (Temoniera), SHV (sulfhydryl variable), qui sont généralement des β -lactamases à médiation plasmidique des bacilles à Gram négatif. Aujourd'hui, comme signalé plus haut, à la classe A des β -lactamases on ajoute la classe C, les métallo- β -lactamases et certaines enzymes de la classe D qui ne sont du tout pas inhibées par ces inhibiteurs. Bien plus les bactéries produisant plusieurs β -lactamases de la classe A

sont résistantes à l'action de ces combinaisons (Bush *et al.*, 1995 ; Bush, 2002 ; Miller *et al.*, 2001; She & Liu, 2002 ; Yang, 1998).

Depuis plus d'une vingtaine d'années, des études ont été menées pour la recherche des inhibiteurs plus efficaces et ayant une bonne activité sur toutes les classes de β -lactamase. Plusieurs inhibiteurs ont été proposés entre autres les composés dérivant des pénèmes (BRL-42715, 6-méthylidène pénème), les dérivés des céphalosporines, le monobactame Syn 2190, les composés non- β -lactamines (dérivés de l'acide boronique, rhodamines, acyl phosphonates, AVE 1130A), les analogues et les dérivés de la protéine inhibant la β -lactamase. Ces différents composés peuvent inhiber les enzymes de la classe A, C et de la classe B (acide picolinique, acide succinique, l'acide mercaptocarboxylique) (Hyodo *et al.*, 1997 ; Farmer *et al.*, 1994 ; Phillips *et al.*, 1997 ; Huang *et al.*, 2000 ; Weiss *et al.*, 2004 ; Nishida *et al.*, 1999 ; Bonnefoy *et al.*, 2004 ; Concha *et al.*, 2000 ; Mollard *et al.*, 2001 ; Toney *et al.*, 2001). Ces inhibiteurs inhibent aussi les enzymes essentielles à sérine active des mammifères et les metallo- β -lactamases non-bactériennes. Bien plus ces inhibiteurs sont non stables et ont une faible pénétration au niveau de la membrane des bactéries à Gram-négatif. Le problème demeure alors entier et la recherche de cet inhibiteur miracle continue.

Aujourd'hui, la résistance des bactéries aux antibiotiques est devenue l'un des problèmes les plus importants des thérapeutiques anti-infectieuses dans le monde et dans l'industrie pharmaceutique. Les infections causées par les bactéries résistantes aux antibiotiques sont responsables d'un taux élevé de morbidité et de mortalité, comparé aux infections causées par les bactéries sensibles aux antibiotiques. Le coût de traitement annuel des infections causées par des germes résistants aux antibiotiques est estimé aux Etats Unis à environ quatre milliards de dollars et est en pleine augmentation (Archibald *et al.*, 1997). Confronté au problème du coût des antibiotiques, la plupart des populations des pays développement se tournent vers la médecine traditionnelle. Cette médecine constitue une part intégrale de la culture de l'Afrique noire et selon les estimations de l'OMS (2002), la majorité de la population africaine (80%) utilise la médecine traditionnelle dans les soins de santé primaire. Au Cameroun, les populations utilisent les plantes dans le traitement de plusieurs maladies (maladies infectieuses, inflammations, blessures et autres...) (Adjanooun *et al.*, 1996).

Le but de ce travail est de caractériser les différents types de β -lactamases à spectre élargi produites par les Entérobactéries isolées des patients hospitalisés à l'Hôpital Central de Yaoundé et de rechercher les inhibiteurs de β -lactamases dans deux plantes médicinales,

Garcinia lucida (Clusiaceae) et *Bridelia micrantha* (Euphorbiaceae) utilisées par la population dans le traitement de plusieurs maladies.

Ce manuscrit s'articule autour de 4 chapitres

Le premier chapitre de ce travail portera principalement sur la revue de la littérature concernant la paroi bactérienne, les protéines liants pénicillines, les β -lactamases et les plantes médicinales. Le deuxième chapitre présentera les matériels et les méthodes expérimentales utilisés. Le troisième chapitre sera consacré à la présentation de l'ensemble des résultats obtenus et le quatrième aux discussions qui en découlent. Nous terminerons ce travail par une conclusion et des perspectives de recherche à venir.

CHAPITRE I
REVUE DE LA LITTERATURE

CHAPITRE I. REVUE DE LA LITTERATURE

I.1. Paroi bactérienne

La paroi bactérienne est une structure unique qui entoure la membrane cellulaire. Bien que n'étant pas présente chez toutes les espèces bactériennes, la paroi est une structure cellulaire très importante. Elle joue plusieurs rôles (Nanninga, 1998) :

- maintient la forme de la cellule ;
- préserve l'intégrité de la cellule en contrant l'effet de la pression osmotique interne ;
- intervient dans la division cellulaire ;
- offre les sites de fixation pour les virus comme les bactériophages ;
- sert enfin de support pour les extensions de surface comme les pili, les flagelles et les fimbriae qui émanent de la paroi et se prolongent au-delà d'elle.

La structure de la paroi de toutes les bactéries n'est pas identique. En fait sa composition constitue un critère très important dans l'analyse et la différenciation des espèces bactériennes. On distingue deux types majeurs de paroi bactérienne : Gram-positif et Gram-négatif. La paroi des bactéries à Gram-positif est composée par plusieurs couches de peptidoglycane (muréine) sur laquelle sont ancrés les polysaccharides acides (acide téichoïque). La paroi des bactéries à Gram-négatif quant à elle, est caractérisée par une couche de muréine, qui est située entre la membrane externe et la membrane cytoplasmique, donc dans le périplasma (espace entre la membrane cytoplasmique et la membrane externe). Le peptidoglycane est relié à la membrane externe par des lipoprotéines. Ainsi, la membrane externe (sur laquelle sont fixés les polysaccharides) possède à sa face interne les lipoprotéines et à sa face externe les lipopolysaccharides (Van Hoof, 2001) (Figure1).

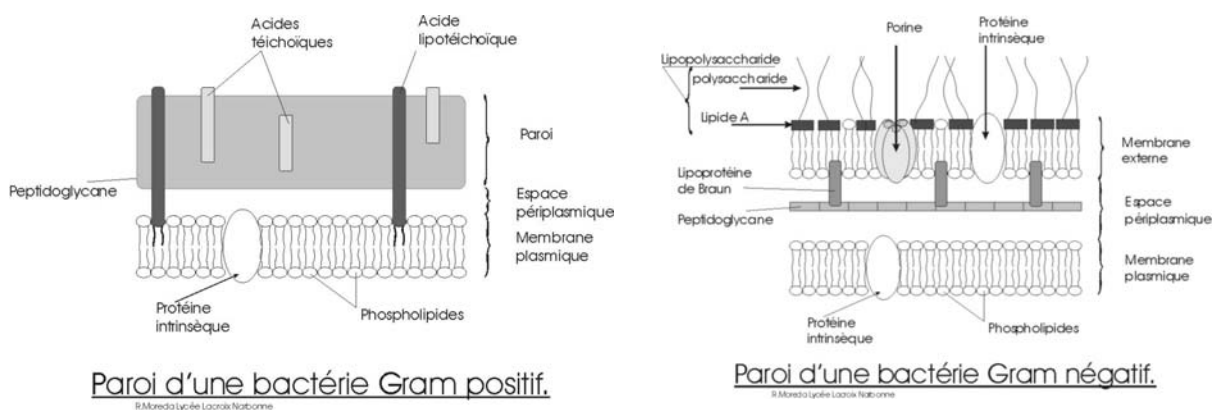


Figure1 : Paroi des bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif (<http://pedagogie.ac-montpellier.fr/discipline/sti/biotechn/microbio-html>)

Par définition, un antibiotique consiste en une substance chimique naturelle produite par un microorganisme qui détruit ou inhibe la croissance microbienne spécifiquement à faible concentration. Pour être actif, l'antibiotique doit traverser la paroi bactérienne soit de manière active ou passive. Dans le cas du transport passif, l'antibiotique utilise une protéine (porine) qui forme un canal dans la membrane externe. Ceci entraîne généralement une très grande sélectivité favorisant les petites molécules (Masse molaire < 1000) hydrophiles. Avec le transport actif, l'antibiotique est confronté à la paroi bactérienne et dans la plupart des cas à la membrane plasmique (Dijkstra et Keck, 1996). Le peptidoglycane fonctionne comme une passoire moléculaire et ne représente pas de véritable barrière de perméabilité pour la plupart des antibiotiques mais la membrane plasmique est une barrière importante. La paroi des bactéries à Gram-négatif du fait de la présence de la membrane externe (bicouche lipidique, présence des porines) est moins perméable que celle des bactéries à Gram-positif (Van Hoof, 2001).

Bien que la composition chimique du peptidoglycane soit variable entre les groupes bactériens, son architecture de base est conservée. Le peptidoglycane est un réseau des chaînes glycanes non ramifiées composé de sous-unités de saccharides réticulées avec des courts peptides (tétrapeptides). Contrairement à la chitine, le peptidoglycane n'est pas une structure cristalline, mais un polymère dont les propriétés élastiques résident dans la liberté conformationnelle des liaisons peptidiques (Van Hoof, 2001).

Les chaînes glycanes se composent de résidus alternatifs de N-acétyl-glucosamine (GlcNAc) et d'acide N-acétyl-muramique (MurNAc) liés par les liaisons β (1 - 4) (Figure 2) et typiquement constitués de 10 à 100 unités de disaccharide (Hartz *et al.*, 1990). Le groupe carboxylique de chaque résidu d'acide N-Acétyl-Muramique est substitué par une sous-unité de peptide, qui est le plus souvent L-alanyl- γ -D-glutamyl-diaminopimelyl (ou L-lysyl)-D-alanyl-D-alanine dans le peptidoglycane naissant et qui perd plus tard un ou les deux résidus de D-alanine dans le peptidoglycane mûr. Les tétrapeptides des chaînes glycanes, sont liés entre eux par le groupe DA (diamino) au résidu D-Ala. Quelque fois, les deux tétrapeptides ne sont pas directement liés mais sont reliés par l'intermédiaire d'un pont d'interpeptide constitué d'un ou de plusieurs acides aminés surtout observé chez les bactéries à Gram positif, ou le nombre d'acide aminés varie entre 1 et 5 (Schleifer & Kandler, 1972) (Figure 2). Chez *Staphylococcus aureus* par exemple, le pont interpeptidique est constitué de 5 glycines

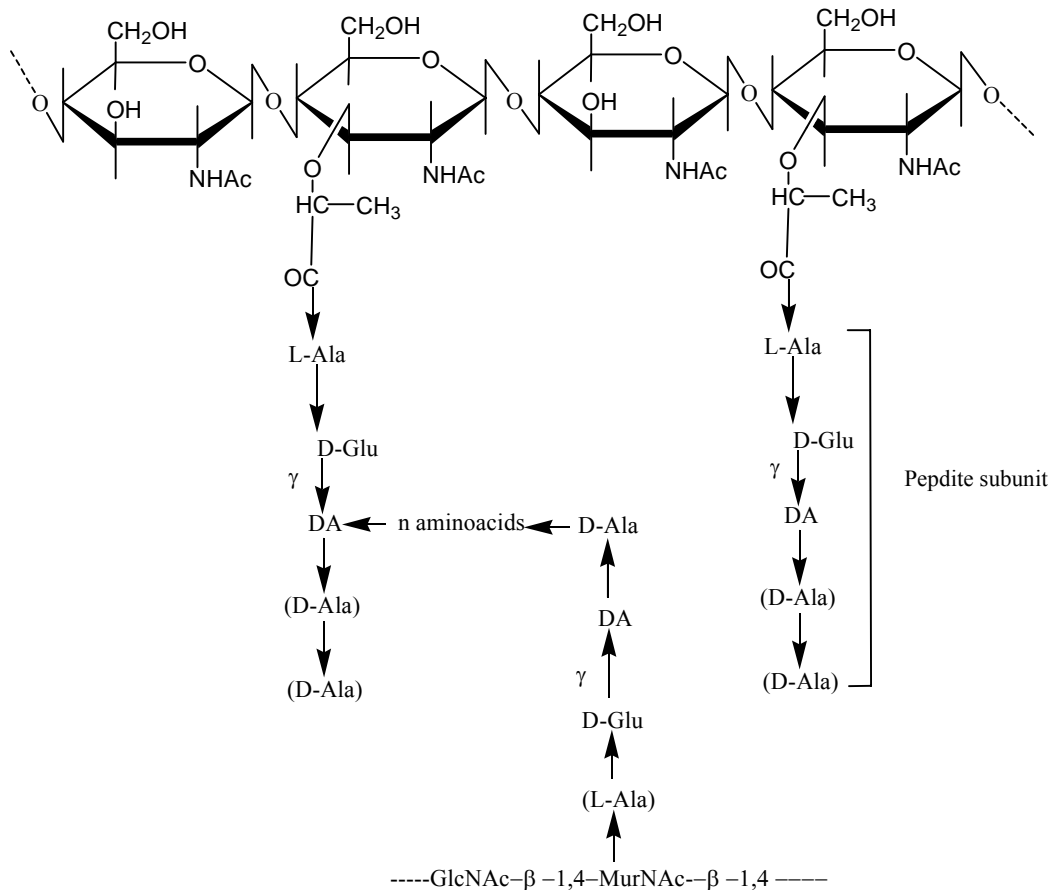


Figure 2 : Schéma de la structure primaire du peptidoglycane bactérien (van Heijenoort, 2001) Abréviations : GlcNAc : N-acetylglucosamine, MurNAc : N-acetylmuramic acid, DA : diamino acid (general diaminopimelique acid or L-lysine) ; n : number of amino acids in the cross-bridges, n=0 to 5 depending on the organism) D-ala-Often missing in the peptidoglycan of many organism.

La biosynthèse du peptidoglycane se déroule en deux étapes (van Heijenoort, 2001). La première étape consiste en la synthèse des monomères grâce aux enzymes localisés dans le cytoplasme ou sur la face interne de la membrane cytoplasmique. Le produit final de cette étape est un intermédiaire lipidique undecaprenol (Lipide II). Ce produit est transporté à travers la membrane plasmique par un mécanisme non encore élucidé vers la surface externe de la membrane où il sert de substrat initial aux réactions de polymérisation qui auront lieu pendant la deuxième étape. La deuxième étape de synthèse du peptidoglycane se résume en la polymérisation des monomères et l'incorporation du nouveau matériel dans le peptidoglycane préexistant (Figure 3). L'assemblage final des monomères pendant la seconde phase, peut se diviser en 5 groupes de réaction : formations de l'uridine 5'-pyrophosphate- N – acétylglucosamine (UDP-GlcNAc), uridine 5'-pyrophosphate-N - acide acétyl-muramique (UDP-MurNAc), UDP-MurNAc-peptides et les intermédiaires lipidiques (Figure 3). La

polymérisation du résidu C55-disaccharide-pentapeptide pour constituer le peptidoglycane fait intervenir deux types majeurs de réactions enzymatiques :

- les glycosyltransférases qui catalysent la formation de la chaîne polysaccharidique linéaire;
- les transpeptidases qui catalysent la formation des liaisons peptidiques croisées assurant ainsi la réticulation de l'hétéropolymère.

Cette étape de la synthèse du peptidoglycane représente une cible privilégiée pour de nombreux antibiotiques (β -lactamines, glycopeptides, bacitracine). Ces agents antimicrobiens sont capables d'inhiber la biosynthèse de la muréine en inhibant l'étape 2 qui est plus facilement accessible car se réalisant à la surface externe de la membrane.

La transpeptidation et la transglycosylation sont effectuées par des protéines bactériennes uniques appelées les protéines-Liant-Pénicilline (PLP) ou tout simplement Penicilline-Binding-Proteins (PBPs). Ce sont des protéines qui appartiennent à la famille des protéines à sérine active. Elles sont encore appelées DD-peptidases (Frère et Joris, 1985).

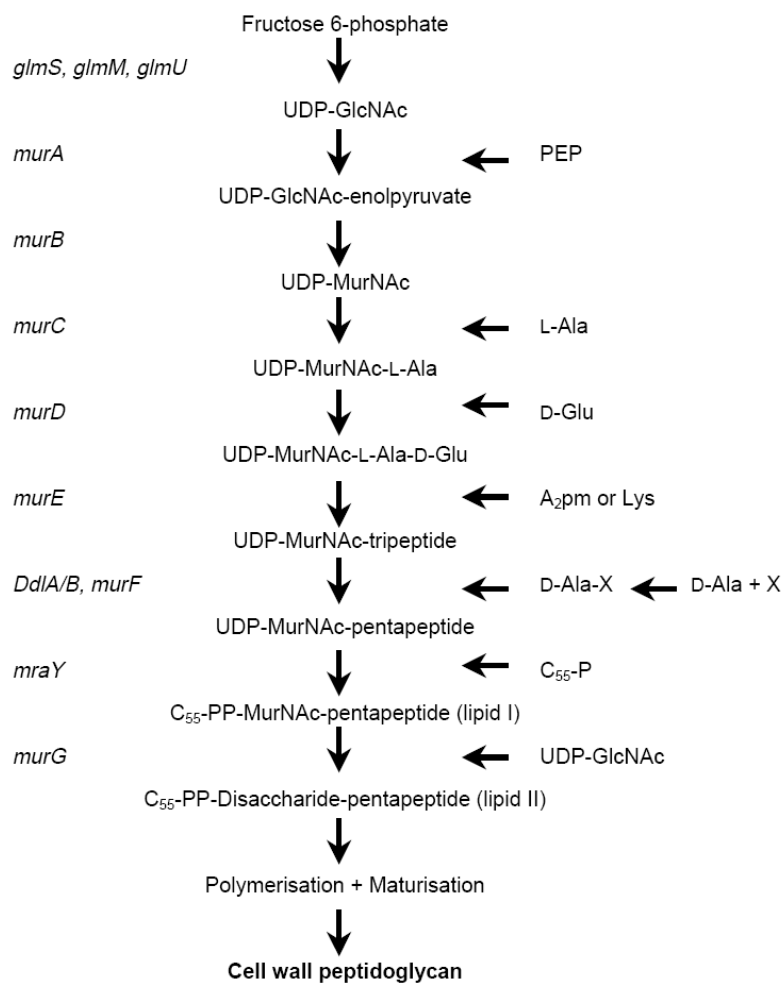


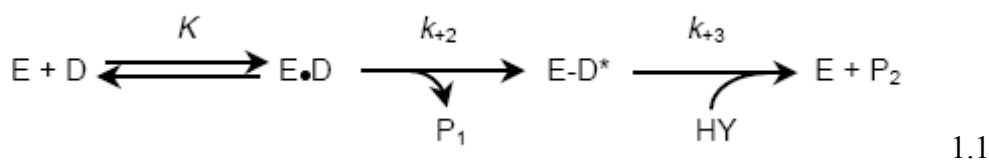
Figure 3 : Biosynthèse du peptidoglycane (Van Hoof, 2001)

I.2. Protéines-Liant-Penicilline

Les cibles des β -lactamines sont des protéines enzymatiques insérées sur la face externe de la membrane cytoplasmique, dénommées protéines liant la pénicilline (PLP). Les PLP interviennent dans la synthèse et le remodelage du peptidoglycane, constituant principal de la paroi bactérienne (Ghuysen, 1991 ; Nanninga, 1991).

Le nombre et la nature des PLP varient selon les espèces bactériennes. Les travaux de Spratt et Pardee (1975) ont permis de séparer six de ces protéines et de les classées en deux grands groupes en fonction de leur poids moléculaire. Ainsi on distingue les PLP de haut poids moléculaire (PLP1 à 3) et celles de faible poids moléculaire (PLP4 à 6). Les PLP de haut poids moléculaire sont des molécules multidomaines, constituées d'une courte région cytoplasmique se résumant au domaine transmembranaire, et d'une longue partie périplasmique. Ces PLP de fort poids moléculaires se subdivisent en deux groupes de molécules, le sous-groupe A (possède les activités de trasnglycosylation et de transpeptidation) et le sous-groupe B qui contient un domaine transpeptidase ajouté au domaine N-terminal à fonction inconnue. Les PLP de faible poids moléculaire jouent un rôle dans la catalyse de l'hydrolyse du peptidoglycane (carboxypeptidases) régulant ainsi le nombre de liaison dans la muréine (Ghuysen, 1991 ; 1994). Chez *Escherichia coli*, la PLP1 intervient dans l'élongation de la cellule, la PLP2 dans la forme de la cellule et la PLP3 dans la formation des septa (Spratt, 1975). Chaque espèce bactérienne possède au moins trois et jusqu' à plus de huit PLPs (Hakenbeck and Coyette, 1998).

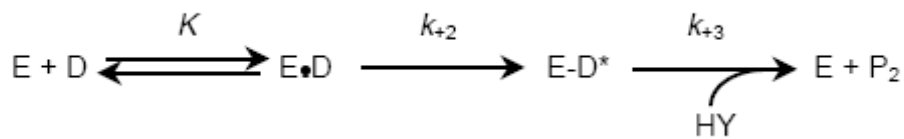
Les PLP sont des cibles physiologiques des antibiotiques de la famille des β -lactamines. Ces cibles létales des bactéries sont des enzymes à sérine active, qui réalisent leur cycle de catalyse par des mécanismes d'acylation/désacylation avec des intermédiaires acylenzymes. Ce mécanisme est schématiquement représenté part un modèle à trois étapes (Ghuysen *et al.*, 1986) :



E est l'enzyme, D le substrat donneur du carbonyle (D-alanyl-D-alanine), HY accepteur nucléophile, P1 et P2 les produits de la réaction de catalyse, E•D le complexe non covalent de Henri-Michaelis, E-D* complexe covalent acyl-enzyme.

I.3. Inhibition des PLPs

Les composés pouvant avoir une analogie structurale du substrat (D-alanyl-D-alanine) des PLPs sont capables d'agir comme des pseudo-substrats et ainsi empêcher la synthèse du peptidoglycane par inhibition de la dernière étape, notamment la transpeptidation. Les β -lactamines constituent un vaste groupe de molécule incluant la pénicilline et les composés apparentés. De part leur analogie structurale avec le D-alanyl-D-alanine, les β -lactamines sont capables d'inhiber l'activité des DD-peptidases par acylation du résidu sérine du site actif des PLPs formant ainsi un complexe covalent acylenzyme stable non catalytique. Le mécanisme de la réaction est représenté en trois étapes comme précédemment (réaction 1.1) (Van Hoof, 2001).



1.2

Cette réaction est pratiquement la même que 1.1, à part le fait que le produit P1 du fait de la présence de la liaison amide dans le noyau β -lactame n'est pas libéré et fait partie de l'acylenzyme. Toutefois la valeur de k_3 est très faible comparée à celle de la réaction 1.1, ce qui entraîne une accumulation de l'acylenzyme. Le complexe covalent E-D* résulte de l'attaque nucléophile du groupement carbonyle du carbone du noyau β -lactame par le groupement hydroxyle de la chaîne latérale de la sérine active. À l'issue d'une attaque nucléophile par une molécule d'eau ou d'un composé aminé, l'enzyme est régénérée et le produit libéré (Frère *et al.*, 1975 ; Fuad *et al.*, 1976).

Les β -lactamines sont caractérisées par la présence dans la structure du noyau de base du cycle β -lactame (Figure 4) et comptent aujourd'hui plus d'une cinquantaine de produits (Matagne *et al.*, 1998).

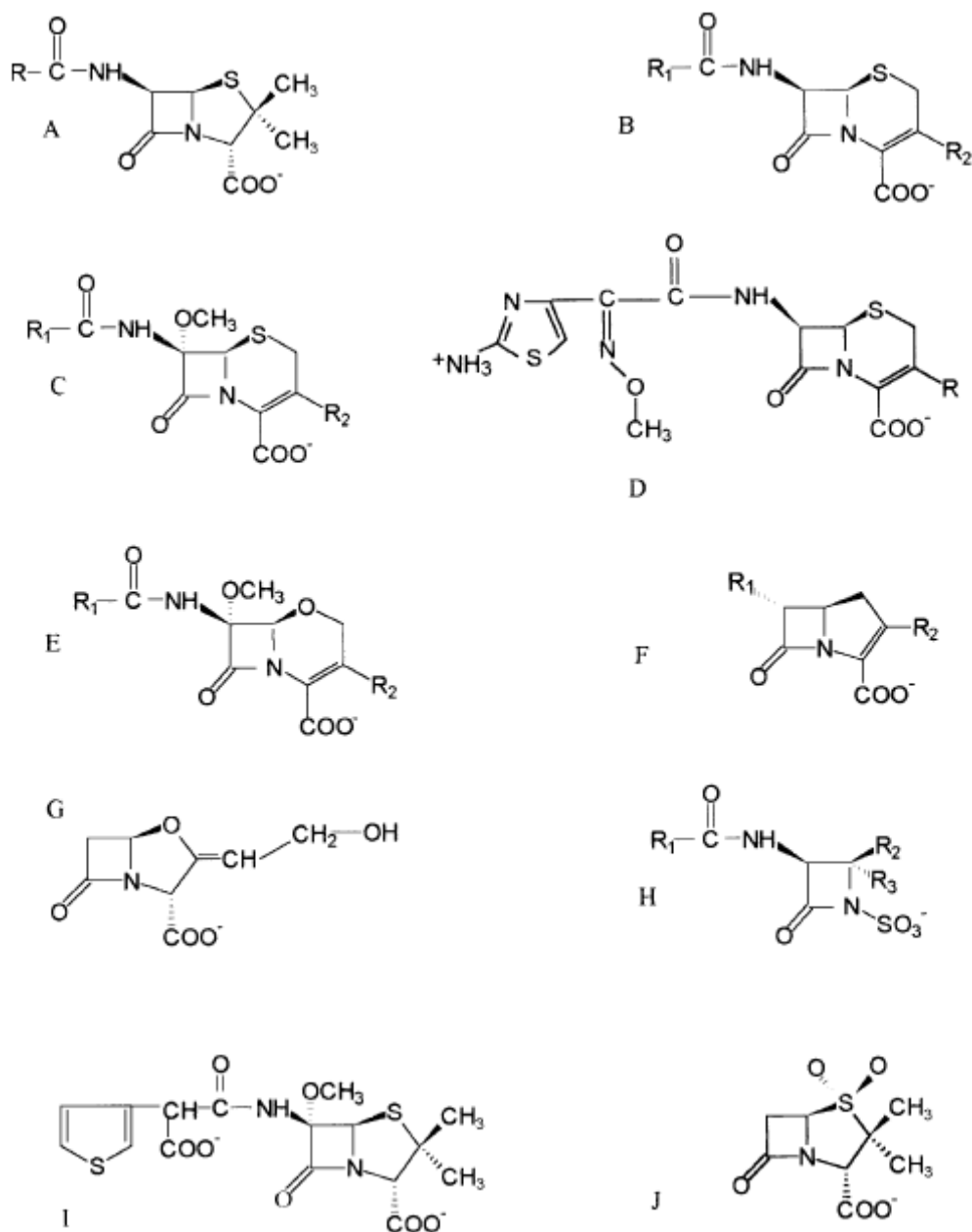


Figure 4 : Structure de quelques β -lactamines (Matagne *et al.*, 1998)

(A) Penams (e.g. benzylpenicillin, ampicillin, amoxicillin), (B) cepheps (cephalosporins), (C) cephamycins (e.g. cefoxitin), (D) cefotaxime (oxymino cephalosporin; R= CH₂-O-CO-CH₃) (E) oxacephamycins (e.g. moxalactam), (F) carbapenems (e.g. imipenem), (G) clavulanate (oxapenam), (H) monobactams (e.g. aztreonam), (I) temocillin (6-a-methoxy penam) and (J) sulbactam (penam sulphone).

I.4. Mécanismes de résistance aux β -lactamines

Les bactéries ont développé différents mécanismes pour contrecarrer l'action des β -lactamines (Galleni *et al.*, 1995 ; Nikaido, 1998 ; Lakaye *et al.*, 1999 ; Walsh, 2003) :

- modification de la cible (PLP) qui les rend moins sensibles aux β -lactamines mais permet de maintenir son activité physiologique normale ;
- synthèse des enzymes (β -lactamases) qui inactivent les β -lactamines par modification chimique ;
- acquisition ou surproduction des pompes efflux qui peuvent expulser l'antibiotique hors de la cellule même contre le gradient de concentration ;
- modification des porines chez les bactéries à Gram-négatif, ayant pour résultat la diffusion plus lente des β -lactamines à travers la membrane externe.

I.4.1. Résistance par production des β -lactamases

Les β -lactamases sont des enzymes bactériennes qui catalysent l'hydrolyse de la liaison amide du cycle lactame des antibiotiques de la famille des β -lactamines. Les gènes qui codent pour ces enzymes sont d'origine chromosomique ou plasmidique. Ces gènes ont aussi été détectés sur des transposons et des intégrons facilitant ainsi le transfert horizontal de ces gènes entre espèces phylogénétiquement éloignées. Ces enzymes sont exportés dans le milieu extracellulaire (bactéries à Gram positif) ou périplasmique (bactéries à Gram négatif). La production des β -lactamases est le mécanisme de résistance le plus répandu et le plus important des bactéries vis-à-vis des β -lactamines (Livermore, 1995). Plus de 290 types de β -lactamases sont décrits (www.lahey.org/studies/inc_webt.html). Les β -lactamases catalysent de manière efficace et irréversible l'hydrolyse de la liaison amide du cycle β -lactame donnant un produit biologiquement inactif qui perd totalement son activité antimicrobienne (Figure 5) (Matagne *et al.*, 1998).

La dissémination des β -lactamases communes et l'apparition de nouveaux enzymes ou d'enzymes mutants sont reliées directement à l'utilisation abusive des β -lactamines dans le domaine de la santé humaine et animale et en agriculture (Kunin *et al.*, 1990 ; Witte, 1997 ; Normark and Normark, 2002)

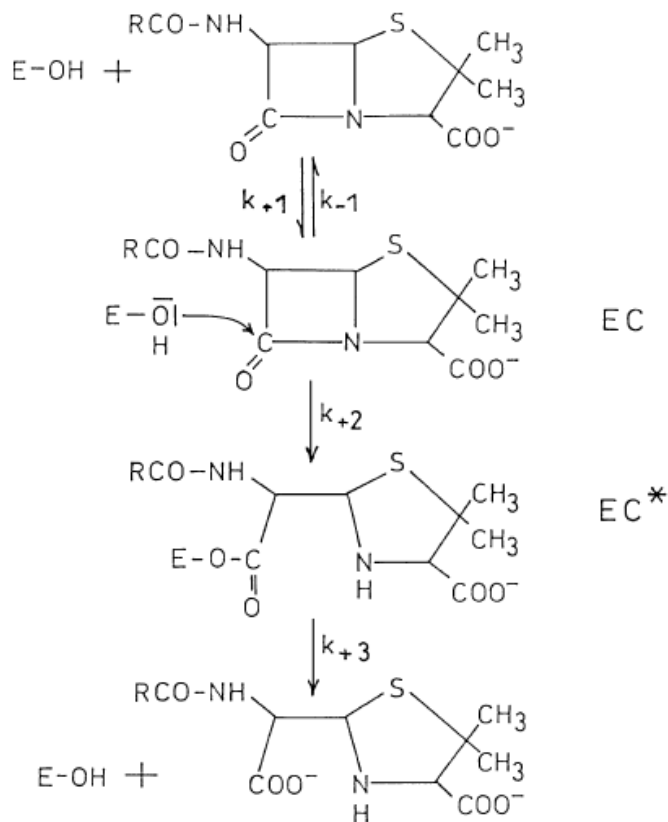


Figure 5 : Voie catalytique générale des β -lactamases à sérine active (Matagne *et al.*, 1998)
En général, l'acylation (k_{+2}) et l'hydrolyse de l'acylenzyme (k_{+3}) sont rapides.

Généralement, Les β -lactamases sont classées suivant deux schémas : La classification moléculaire de Ambler (Ambler *et al.* 1980) et la classification fonctionnelle de Bush-Jacoby-Medeiros (Bush *et al.*, 1995). La classification moléculaire tient compte de la structure primaire des différentes β -lactamases et les divisent en quatre classes (A à D). Pour la classification fonctionnelle, Les auteurs tiennent compte de la fonctionnalité des β -lactamases (substrat, profil d'inhibition) et divisent aussi ces enzymes en quatre groupes (1 à 4) avec plusieurs sous-groupes (Annexe, Tableau 15). Quoique différents de par le principe, il existe une correspondance entre les deux schémas (Bush *et al.*, 1995).

Les β -lactamases des classes A, C et D font partie des enzymes à sérine active, c'est-à-dire qui possèdent dans leur site actif une sérine qui intervient dans le mécanisme d'acylation au cours de l'hydrolyse des β -lactamines. Par contre la classe B inclut les métallo- β -lactamases dont l'activité nécessite la présence d'ions métalliques.

La classe A est la plus diversifiée, on y retrouve les pénicillinases des bactéries à Gram positif, les β -lactamases plasmidiques à large spectre qui hydrolysent les céphalosporines avec autant d'efficacité que les pénicillines, les β -lactamases à spectre élargi qui hydrolysent les céphalosporines de 3^{ième} génération et les monobactames. La majorité de ces enzymes est sensible aux inhibiteurs suicides (acide clavulanique, sulbactame et tazobactame) utilisés en médecine. Les principaux représentants de ce groupe sont les β -lactamases du type TEM, SHV et très récemment le type CTX-M.

Dans la classe C, on retrouve les céphalosporinases qui sont des enzymes résistantes à l'action de l'acide clavulanique et le sulbactame ; toutefois certaines sont faiblement inhibées par le tazobactame (Doi *et al.*, 2004). Leur hyperproduction est associée au phénotype de multirésistance observé chez certains bacilles à Gram négatif. Au départ à médiation chromosomique, les β -lactamases de la classe C sont aussi aujourd'hui à médiation plasmidique (Philippon *et al.*, 2002). Les représentants de ce groupe sont les enzymes du type, AmpC, FOX, ACT, CMY.

La classe D regroupe les β -lactamases qui hydrolysent les isoxazolylpénicillines comme la cloxacilline et l'oxacilline. Ces dernières sont réfractaires à l'hydrolyse par les autres classes de β -lactamases et possèdent une certaine activité inhibitrice. On les appelle des oxacillinases et sont représentées par les β -lactamases du type OXA. Ces enzymes sont plus ou moins résistantes à l'action de l'acide clavulanique, mais sont bien inhibées par le tazobactame (Livermore, 1995).

Contrairement aux sérine- β -lactamases, les β -lactamases de la classe B nécessitent la présence d'un ou deux ions zinc pour être actives. Leur importance clinique est liée au fait qu'elles hydrolysent les carbapénèmes, composés qui échappent à l'activité des β -lactamases à sérine active. La plupart des métallo- β -lactamases hydrolysent une variété de pénicillines et de céphalosporines, et sont insensibles aux inhibiteurs classiques (acide clavulanique, sulbactame, tazobactame). A partir de la séquence des enzymes, cette classe est subdivisée en trois sous classes, B1, B2, et B3 (Galleni *et al.*, 2001). La production de ces enzymes par les bactéries pathogènes telles *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacteroides fragilis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Chryseobacterium meningosepticum*, *Acinetobacter baumannii*, rend difficile le choix d'une antibiothérapie efficace.

I.4.2. β -lactamases à spectre élargi

I.4.2.1. Généralités

Les β -lactamases à spectre élargi (BLSE) constituent un groupe d'enzymes qui ont la propriété commune de conférer la résistance aux pénicillines, à la 1^{ère}, 2^{nde} et 3^{ème} génération de céphalosporines, à l'aztréoname (mais non aux céphamycines et carbapénèmes) par hydrolyse de ces antibiotiques, et qui sont inhibées par les inhibiteurs des β -lactamases tel l'acide clavulanique (BUSH *et al.*, 1995).

La présence des BLSE a été décrite pour la première fois chez *Klebsiella ozaeniae*, en 1983 en République Fédérale d'Allemagne, puis en 1984 chez *K. pneumoniae* et *E. coli* en France et en Tunisie (Kliebe *et al.*, 1985 ; Knothe *et al.*, 1983). Ces enzymes avaient été désignées céfotaximase et ceftazidimase car elles conféraient aux bactéries qui les produisaient une résistance préférentielle à la céfotaxime ou à la ceftazidime. Elles inactivaient aussi d'autres oxyimino- β -lactamines telles que la ceftriaxone et l'aztréoname. La répartition de ces enzymes est aujourd'hui mondiale (Bradford, 2001 ; Paterson & Bonomo, 2005).

L'utilisation des techniques moléculaires et la détermination des séquences peptidiques ont permis de démontrer que la plupart des BLSE dérivent des pénicillinases déjà connues (TEM-1, TEM-2, SHV-1) par substitution d'un ou de plusieurs acides aminés qui leur permet d'hydrolyser oxyimino- β -lactamines et les monobactames (Bush *et al.*, 1995). Aujourd'hui on assiste à une émergence des BLSE non TEM et non SHV incluant les types CTX-M, PER, VEB, GES and BES (Bradford, 2001). Les BLSE sont à médiation plasmidique et appartiennent à la classe moléculaire A de Ambler et au groupe 2be de la classification de Bush-Jacoby- Medeiros à l'exception des BLSE OXA (Classe D de Ambler et 2d de Bush-Jacoby-Meideros) (Bush *et al.*, 1995).

De par leur propriété d'être inhibées par l'acide clavulanique elles se différencient des β -lactamases du groupe C produites par les bacilles à Gram-négatif tel *Enterobacter* qui peuvent posséder un spectre élargi par surproduction mais qui sont résistantes à l'acide clavulanique et sont sensibles aux céphalosporine de 4^{ème} génération (céfépime, cefpirome) (Cosgrove *et al.*, 2002). Elles diffèrent aussi des métallo- β -lactamases qui quoique hydrolysant toutes les β -lactamines (pénicillines, céphalosporines et carbapénèmes) ne sont inhibées que par l'EDTA (Walsh *et al.* 2005).

I.4.2.2. Détection

Depuis leur apparition en Europe en 1983, les BLSE ont aujourd'hui une répartition mondiale. On assiste à une augmentation de plus en plus élevée de la prévalence et une émergence grandissante de nouveau type. Bon nombre de laboratoires de microbiologie clinique se limitent à utiliser les points critiques des antibiotiques et ne font aucun effort pour détecter les souches productrices de BLSE ou en sont incapables (Tenover *et al.*, 1999). Ces points critiques sont variables de pays en pays (Tableau 1) et certaines souches productrices de BLSE apparaissent sensibles aux céphalosporines de 3^e génération. Des travaux sur l'évaluation d'une collection de souches productrices de BLSE en utilisant les points critiques du « Clinical Laboratory Standards Institute » (ancien « National Committee for Clinical Laboratory Standards ») ont montré que 13 à 49% des souches testées sont sensibles au cefotaxime, 36 à 79% au ceftriaxone, 11 à 52% au ceftazidime et 10 à 67% à l'aztréoname. Approximativement 40% des souches testées sont sensibles à au moins une oxyimino- β -lactamine et 20% à toutes les oxyimino- β -lactamines. Cette apparente sensibilité peut s'expliquer par le fait que les BLSE hydrolysent différemment les céphalosporines et la perméabilité envers les différentes oxyimino- β -lactamines n'est pas la même (Paterson & Bonomo, 2005). Il est donc nécessaire d'avoir des méthodes adéquates qui permettent de détecter les BLSE. Différentes approches ont été développées pour accroître la détection en routine des souches productrices des BLSE et peuvent être classer en deux catégories : les techniques microbiologiques et les techniques moléculaires.

Tableau 1 : Comparaison des points critiques nationaux des antibiotiques pour les Entérobactéries (Paterson & Bonomo, 2005)

Country	MIC breakpoint ^a (μ g/ml)			
	Cefotaxime		Ceftazidime	
	S (\leq)	R (\geq)	S (\leq)	R (\geq)
United States of America (CLSI)	8	64	8	32
United Kingdom	1	2	2	4
France	4	32	4	32
The Netherlands	4	16	4	16
Germany	2	8	4	32
Spain	1	8	1	8
Norway	2	16	2	16
Sweden	4	32	4	16

^a S, susceptible; R, resistant.

I.4.2.2.1. Techniques microbiologiques

Les méthodes microbiologiques utilisent les inhibiteurs des β -lactamases tel l'acide clavulanique, en combinaison avec les oxyimino- β -lactamines tels ceftazidime ou cefotaxime. Le principe de ces méthodes est que le clavulanate inhibe les BLSE et ainsi réduit le niveau de la résistance aux céphalosporines (Bradford, 2001).

La plupart des tests de détection de BLSE sont basés sur la méthode de diffusion de Kirby-Bauer. Ainsi plusieurs méthodes ont été décrites parmi lesquelles, le test de double synergie, la méthode de confirmation du Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), le test à trois dimensions, les tests commerciaux.

Le test de double synergie (Jarlier *et al.*, 1988) entre un disque de céphalosporine de 3^{ème} génération ou aztréoname et un inhibiteur de β -lactamase tel l'acide clavulanique est l'un des premiers tests à être décrit. C'est le test le plus utilisé et le plus recommandé. Ce test possède plusieurs variantes et est basé sur la mise en évidence d'une restauration de l'activité des céphalosporines de 3^{ème} génération ou de l'aztréoname en présence d'un inhibiteur enzymatique. Le test de synergie peut être insensible pour plusieurs raisons :

- la distance entre les disques ;
- l'inaptitude des inhibiteurs à inhiber toutes les β -lactamases (céphamycinases qui ne sont pas inhibées par exemple) ;
- l'inaptitude du test de détecter la présence des BLSE (montrer l'image de synergie chez les souches productrices des céphalosporinases chromosomiques).

Malgré ces défaillances, c'est une méthode assez utilisée en routine car elle ne nécessite pas beaucoup de matériel et est de réalisation facile.

L'interprétation de la faible diminution de la sensibilité des souches vis-à-vis des céphalosporines de 3^{ème} génération et de l'aztréoname n'est pas une méthode assez fiable car la diminution de la sensibilité peut impliquer un mécanisme de résistance autre que la production des BLSE (Thomson & Sanders, 1992).

Le test à trois dimensions (Thomson & Sanders, 1992) permet non seulement d'avoir les informations sur le profil des β -lactamases, mais aussi sur la sensibilité de la souche vis-à-vis des antibiotiques utilisés. Cette méthode a une sensibilité élevée, mais n'est pas de réalisation facile.

L'utilisation du disque de cefpodoxine (30 μ g) est une méthode qui permet de détecter les BLSE chez *E. coli* et *K. pneumoniae*. Ce disque n'est pas beaucoup utilisé par les laboratoires de microbiologie clinique (Thomson, 1995) ;

L'utilisation des disques de ceftazidime de 5 µg est proposée par Jacoby & Han (1996) pour la détection des BLSE chez *E. coli* et *K. pneumoniae*. Les BLSE sont suspectées lorsque le diamètre d'inhibition est inférieur à 18 mm. Ces auteurs proposent d'ajouter 20 µg de sulbactame sur un disque d'oxymino-céphalosporine. L'augmentation du diamètre d'inhibition de 5 mm comparée au disque sans inhibiteur est signe de la production d'une BLSE ;

Le CLSI propose **l'utilisation de la méthode des disques** pour rechercher la production de la BLSE par *Klebsiella*, *Escherichia coli* et *Proteus mirabilis*. L'obtention d'un diamètre d'inhibition spécifique à un des oxymino-β-lactamines [aztréoname (<28 mm), cefotaxime (< 26 mm), ceftriaxone (<26 mm), ceftazidime (<23 mm), cefpodoxime (<18 mm)] permet de suspecter la production de BLSE. Toutefois la sensibilité de détection est grande si on teste plus d'une de ces cinq β-lactamines. Dès lors on fait appel à un test de confirmation pour confirmer le diagnostic (NCCLS, 2005). Cet institut propose de réaliser les tests de dilution en mettant dans le milieu de culture 1µg/ml d'une des cinq β-lactamines à spectre élargi. Les souches présentant des CMI ≥ 2µg/ml seront suspectées comme productrices de BLSE. Les tests de confirmation consistent en ce qui concerne la méthode des disques à tester le disque de cefotaxime (30µg) ou de ceftazidime (30µg) seul et contenant 10µg d'acide clavulanique. L'augmentation du diamètre d'inhibition d'au moins 5 mm du disque contenant l'inhibiteur comparé à celui du disque sans inhibiteur confirme la production de BLSE par la souche. Pour les méthodes en dilution, le cefotaxime (0,25 -64 µg/ml) ou la ceftazidime (0,25 -128 µg/ml) sera testé en présence de l'acide clavulanique (4µg/ml). La diminution de la concentration minimale inhibitrice (CMI) d'au moins trois fois de la série de double dilution en présence de l'acide clavulanique est indicatrice de la production de BLSE par la souche qui peut être considérée comme résistante à toutes les oxymino-β-lactamines et l'aztréoname (NCCLS, 2005).

Plusieurs industries ont développé des tests de détection de BLSE qui peuvent être utilisés en même temps que les tests de détection des CMI dans les laboratoires de microbiologie clinique et sont commercialisables.

Le test de confirmation par les disques utilisant **les disques BBL Sensi-Disk** (BD Biosciences, Sparks, Md.). Ce test utilise la méthode de diffusion avec les disques de cefotaxime et de ceftazidime seuls et contenant de l'acide clavulanique. La BLSE est détecté lorsque le diamètre d'inhibition de la combinaison céphalosporine/acide clavulanique est supérieure d'au moins 5 mm à celui de la céphalosporine seule.

Les bandelettes E-test pour la détection des BLSE (AB Biodisk, Solna, Sweden). Ces bandelettes renferment sur un bout un gradient de ceftazidime ou de cefotaxime et sur l'autre bout la ceftazidime ou cefotaxime avec l'acide clavulanique. Le test est positif lorsqu'on observe une réduction d'au moins 3 fois de CMI de la ceftazidime en présence de l'acide clavulanique. Ce test est assez sensible (87-100%) et spécifique (95-100%) (Cormican *et al.* 1996 ; Brown *et al.* 2000). Ce test est de réalisation facile mais il arrive que l'acide clavulanique diffuse du côté où la ceftazidime est seule, rendant difficile la lecture (Vercauteren *et al.* 1997). Ce test coûte cher et n'est pas à la portée des laboratoires des pays en développement.

Le test Vitek pour BLSE (bioMérieux Vitek, Hazelton, Missouri). La carte Vitek pour BLSE utilise la ceftazidime ou le cefotaxime seul (0,5µg/ml) et en combinaison avec l'acide clavulanique (4µg/ml). La réduction de la croissance dans les puits contenant l'acide clavulanique comparée à ceux contenant les céphalosporines seules indique la présence de BLSE. La sensibilité et la spécificité de ce test sont supérieures à 90% (Sanders *et al.*, 1996). L'avantage certain de ce test est qu'il peut être facilement intégré dans les différents processus des laboratoires qui utilisent déjà le système Vitek. Le coût de l'équipement pour la réalisation de ce test dans les laboratoires des pays en développement est très élevé.

D'autres systèmes automatisés tels **Dade Behring MicroScan** (Sacramento, Calif.) et le système microbiologique automatisé **BD Phoenix de Becton Dickinson Biosciences** (Sparks, Md) sont aussi capables de détecter les BLSE.

Sur ces tests commerciaux, Linscoh & Brown (2005) ont montré que leur sensibilité variait de 96% (BBL sensi-Disk) à 100% (MicroScan) et leur spécificité de 94% (E-test) à 100% (BBL sensi-Disk).

La plupart de ces tests visent à détecter la production des BLSE par *E. coli*, *Proteus mirabilis* et *Klebsiella*. La détection de ces enzymes chez les souches productrices des céphalosporinases reste un véritable problème. Toutefois Pitout *et al.* (2003) proposent une modification du test de double synergie pour détecter la production des BLSE par ces bactéries. Ils remplacent le disque de ceftriaxone par celui de céfépime (30µg) et placent le disque de pipéracilline/tazobactame (100/10µg) à 25 mm de ce dernier.

A ces techniques basées sur l'antibiogramme, il existe d'autres utilisant les méthodes moléculaires.

I.4.2.2.2. Les techniques moléculaires

Les tests phénotypiques permettent de manière présomptive d'identifier la présence de BLSE. Pour connaître le type de BLSE que produisent les souches cliniques, il faut avoir recours aux techniques moléculaires qui sont assez complexes et laborieuses. Ces techniques requièrent des personnes hautement qualifiées et un laboratoire bien équipé. Elles ne sont pas facilement réalisables en routine surtout dans les pays en développement. Ces techniques ont le mérite d'être spécifiques et permettent de connaître le type de BLSE produit par les isolats cliniques. Plusieurs de ces techniques sont utilisées entre autres : l'utilisation des sondes d'acides désoxyribonucléiques, la « Polymerase Chain Reaction » (PCR) avec plusieurs variantes, l'oligotypage, la « Ligase Chain Reaction », et le séquençage des nucléotides (Bradford, 2001). Ces techniques en plus de la détection permettent aussi de caractériser les BLSE.

I.4.2.3. Diversité des types de BLSE

On dénombre jusqu'à ce jour environ 200 BLSE appartenant à plusieurs types parmi lesquels les types TEM et SHV sont prédominants.

TEM

Les BLSE de types TEM dérivent de TEM-1 et TEM-2 par substitution d'un ou de plusieurs acides aminés. Plus de cent types existent et leurs points isoélectriques varient entre 5,4 - 6,5. (<http://www.lahey.org/studies/temtable.htm>). Bien que les BLSE de ce types soient le plus souvent produites par *E. coli* et *K. pneumoniae*, ces enzymes ont été aussi mises en évidence chez les autres espèces d'Entérobactéries (*Enterobacter aerogenes*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Proteus rettgeri* et *Salmonella* spp.), chez *Pseudomonas aeruginosa* (TEM-42) et *Capnocytophaga ochraceae* (TEM-17) (Bradford, 2001).

SHV

La β -lactamase SHV-1 qui est l'enzyme à partir de laquelle les BLSE de type SHV dérivent par substitution d'un ou de plusieurs acides aminés est très fréquentes chez *K. pneumoniae*. Cette enzyme hydrolyse les pénicillines, les céphalosporines mais pas les oxyimino-céphalosporines et l'aztréoname. La transformation du phénotype non-BLSE en phénotype BLSE est pratiquement due toujours au remplacement de la glycine en sérine à la position 238. La mutation en position 240 qui remplace le glutamate en lysine ne fait qu'augmenter l'activité de l'enzyme. La présence de la séquence d'insertion IS26 sur le gène

SHV faciliterait l'acquisition du phénotype BLSE (Hammond *et al.*, 2005). Environ 70 BLSE du type SHV ont été décrites et leurs points isoélectriques varient de 7,0 à 8,2 (<http://www.lahey.org/studies/webt.html#SHV>). La majorité de ces enzymes ont été décrites chez les souches de *K. pneumoniae*. Toutefois ces enzymes ont été trouvées chez *Citrobacter freundii*, *C. diversus*, *E. coli*, *Enterobacter cloacae* et *P. aeruginosa* (Bradford, 2001 ; Gangoué Piéboji, 2000 ; Gangoué-Piéboji *et al.*, 2005b).

CTX-M

Les BLSE du type CTX-M font partis des BLSE non-TEM et SHV et possède moins de 40% d'homologie avec les BLSE TEM et SHV. Elles sont plasmidiques et confèrent une forte résistance au céfotaxime et au ceftriaxone et ont juste un effet marginal sur la CMI de la ceftazidime (Tzouvelekis *et al.* 2000). Reportées pour la première fois au milieu des années 1980, elles montrent un niveau de dissémination dans les bactéries et partout dans le monde qui a augmenté dramatiquement depuis 1995. Les enzymes de la famille CTX-M comprennent aujourd'hui une cinquantaines d'enzymes isolées de nombreuses espèces d'Entérobactéries et qui sur la base de leur séquences protéiques sont divisés en cinq groupes, CTXM-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-9 et CTX-M-25) (Bonnet, 2004, <http://www.lahey.org/studies/other.html#table1>).

Des travaux ont montré que les gènes plasmidiques des CTX-M ont des progéniteurs des enzymes naturelles chromosomiques de classe A de *Kluyvera ascorbata* (CTX-M-2), *Kluyvera georgiana* (CTX-M-8), *Kluyvera cryocresens* (CTX-M-1) (Bonnet, 2004).

OXA

Les BLSE OXA diffèrent des types TEM et SHV par le fait qu'elles appartiennent à la classe D et au groupe 2d (Bush *et al.* 1995). Contrairement à ce qui est observé dans les BLSE de la classe A qui sont produites le plus souvent par les Entérobactéries, les BLSE OXA sont en grande majorité détectée chez *P. aeruginosa*. Plus d'une dizaine de ces enzymes ont été mises en évidence et la majorité provient de OXA-10 par mutation d'un ou de plusieurs acides aminés. A la différence des autres types, les BLSE OXA renferment plus d'une vingtaine de représentant non-BLSE (Bradford, 2001 ; <http://www.lahey.org/studies/other.html#table1>).

Les autres types de BLSE

En plus des BLSE connues, de nouvelles familles classées parmi les BLSE non-TEM et non-SHV ont apparues. Ces BLSE appartiennent à la classe A de Ambler et ont été isolées non seulement de *P. aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* mais aussi des Entérobactéries. Parmi ces nouvelles familles, le type GES (Guiana Extended Spectrum beta-lactamase) est le plus développé avec environ 9 représentants, les autres types, PER (P. Normann, E., Ronco, R. Labia beta-lactamase) et VEB (Vietnamasse Extended Spectrum beta-lactamase) n'ont que trois représentants pour chacun (Poirel & Nordmann, 2005 ; <http://www.lahey.org/studies/other.html#table1>).

I.4.2.4. Epidémiologie des BLSE

Découvertes en Europe dans les années 1980, les BLSE ont aujourd'hui une répartition mondiale. Leur prévalence varie d'une région à une autre, d'un pays à un autre, d'une ville à une autre et même d'un hôpital à un autre. Ces variations dépendent de plusieurs facteurs parmi lesquelles la détection de ces enzymes, les mesures de surveillance des maladies infectieuses, l'utilisation abusive des antibiotiques. Les facteurs spécifiques de risque d'acquisition des BLSEs chez les patients hospitalisés sont une longue hospitalisation, la sévérité de la maladie, l'intervention chirurgicale, le séjour au service de soins intensifs, l'intubation et la ventilation mécanique et le port de cathéters artériels ou urinaires. D'abord qualifiés de résistance hospitalière, les BLSE sont de plus en plus détectées chez des patients communautaires. Des travaux ont été rapportés en Espagne, Israël, Etats Unis, Angleterre, Canada et Tanzanie sur les infections communautaires causées par les BLSE. Les causes de ces infections ne sont pas encore clarifiées. Toutefois la consommation des produits alimentaires, des animaux ayant consommé les antibiotiques et la fréquentation des patients hospitalisés devraient être explorées. (Bradford, 2001 ; Paterson & Bonomo, 2005);

Aux Etats Unis, la prévalence des Entérobactéries productrices des BLSEs varie de 0 à 25% avec une moyenne nationale de 3% (Centers for Disease Control and Prevention, National Nosocomial Infectious surveillance, <http://www.cdc.gov/ncidod/hip/SURVEILL/NNIS.HTM>). Au Canada, la prévalence de production des BLSE est faible et est de l'ordre de 0,25% pour *E. coli* et 0,8% pour *Klebsiella sp.* (Mulvey *et al.*, 2004).

En Europe la prévalence des BLSE chez les entérobactéries varie d'un pays à un autre. Une étude récente portant sur *E. coli*, *K. pneumoniae* et *Enterobacter spp.* a montré que la

prévalence de BLSE est de 4,7% en Europe du Nord contre 13,5% au Sud de l'Europe (Bouchillon *et al.*, 2004).

Au Japon, le pourcentage de résistance aux β -lactamines par production de BLSE chez *E. coli* et *K. pneumoniae* est assez faible. Les travaux de Yagi *et al.* (2000) ont montré que ce pourcentage est <1% pour *E. coli* et 0,3% pour *K. pneumoniae*. Dans d'autres régions de l'Asie, la proportion de *E. coli* et *K. pneumoniae* productrices de BLSE varie de 4,8% en Corée (Pai *et al.*, 1999) à 8,5% au Taiwan (Yan *et al.*, 2000) et supérieur à 12% à Hong Kong (Ho *et al.*, 2000).

Des travaux portant sur la production des BLSE par les Entérobactéries en Afrique ont été limités en Afrique saharienne. Des données sur l'Afrique sub-saharienne sont rares et éparses. Des études ont rapporté la présence des BLSE dans les pays de l'Afrique du Nord, au Mali, au Sénégal, au Nigeria, au Cameroun, en République Centrafricaine (RCA), en Ethiopie, au Kenya, en Tanzanie et Afrique du sud (Frank *et al.* 2006 ; Paterson & Bonomo, 2005 ; Seid & Astral ; 2005 ; Pitout *et al.*, 1988 ; Gangoué Piéboji, 2000 ; Weil *et al.*, 2004). Une étude récente a montré un taux de Production de BLSE par les Entérobactéries (*E. coli*, *K. pneumoniae* ; *Enterobacter* sp.) variant 15,9% (Afrique du Sud) à 38,5% (Egypte) (Bouchillon *et al.* 2004). Seid & Asrat (2005) ont rapporté une prévalence de production de BLSE de 33,3% chez *Klebsiella* sp. dans les hôpitaux de la région d'Harar. Au Cameroun, Gangoué-Piéboji *et al.* (2005b) rapportent dans un hôpital à Yaoundé la prévalence de production de BLSE de 12 % chez plusieurs espèces d'Entérobactéries répartie de la manière suivante : *E. coli* (14,3%), *Klebsiella* spp. (18,8%), *Proteus* spp. (1,8%), *Enterobacter* spp. (6,5 %) et *Citrobacter* spp. (17,6%). En RCA, la prévalence de BLSE chez les Entérobactéries est de 4 % (Frank *et al.*, 2006)

Les différents types de BLSE à l'exception du type OXA qu'on trouve fréquemment en France et en Turquie, ont une répartition géographique mondiale. Toutefois on peut noter la présence exclusive de certaines BLSE dans certains pays ou régions. C'est le cas de TEM-10 qui est très fréquent aux Etats-Unis et rare en Europe. C'est aussi le cas de TEM-3 très fréquente en France et rare aux Etats-Unis (Bradford, 2001). En Afrique, plusieurs types de BLSE ont été déjà mis en évidence dans différents pays. En Afrique du Sud les BLSE TEM-53, 63, 131 ; SHV-2, 5, 12, 19, 20, 21, 22 ; CTX-M-2 ont été mises en évidence chez les Entérobactéries, (*K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. mirabilis*, *Salmonella* spp.) et le type GES-2 chez *P. aeruginosa* (Pitout *et al.*, 1998 ; Essack *et al.*, 2001 ; Poirel *et al.*, 2002 ; Kruger *et al.*, 2004 ; Kariuki *et al.*, 2001). En Tanzanie, les Entérobactéries produisent les BLSE SHV-2a,

12, TEM-63, CTX-M-15. Dans ce pays, à l'hôpital pédiatrique de Dar Es Salaam, la prévalence de production de BLSE chez *E. coli* est de 25 % (9/36) et chez *K. pneumoniae* 17% (9/52) (Blomberg *et al.*, 2005). Les BLSE TEM-3, 4, SHV-2, 2a, 12 et CTX-M-27 ont été rapportées en Tunisie (Ben Rejeb *et al.*, 1990 ; Ben Hassan *et al.* 1990 ; Makanera *et al.*, 2003 ; Ben-Hamouda *et al.*, 2004 ; Bouallègue-Godet *et al.*, 2005). SHV-2 et SVH-12 ont été rapportées au Sénégal (Richard *et al.*, 1989 ; Cardinale *et al.*, 2000), SHV-12 au Mali (Weill *et al.*, 2004), TEM-3 au Maroc (AitMhand *et al.*, 2002), SHV-2 en Egypte (Pitout *et al.*, 1998), CTXM-12 au Kenya (Kariuki *et al.* 2001), SHV-12 et CTX-M-1, -15 au Cameroun (Gangoué-Piéboji *et al.*, 2005a, b), SHV2a, SHV-12 et CTX-M-3, -15 en RCA (Frank *et al.*, 2006), CTX-M-15, les types TEM et SHV au Nigeria (Aibinu *et al.*, 2003). Il en ressort que les BLSE du type SHV sont assez répandues en Afrique.

Il est recommandé d'utiliser les carbapénèmes pour soigner les patients infectés par des bactéries productrices de BLSE. Toutefois on peut aussi utiliser les quinolones suivant le site de l'infection (Tableau 2) (Paterson & Bonomo ; 2005 ; Bradford, 2001 ; Livermore ; 1995).

Tableau 2 : Traitement recommandé pour les infections causées par des souches productrices de BLSE (Paterson & Bonomo, 2005)

Infection type	Therapy of choice	Second-line therapy
Urinary tract infection	Quinolone ^a	Amoxicillin/clavualante
Bacteremia	Carbapenem	Quinolone ^a
Hospital-acquired pneumonia	Carbapenem	Quinolone ^a
Intra-abdominal infection	Carbapenem	Quinolone ^a (plus metronidazole)
Meningitis	Meropenem	Intrathecal polymyxin B

^a If the organism is quinolone susceptible.

I.5. Inhibition des β-lactamases et résistances aux inhibiteurs

L'augmentation du nombre et de variété de β-lactamases produites par les bactéries est une sérieuse menace dans l'utilisation clinique des β-lactamines. Aujourd'hui on dénombre environ 290 types de β-lactamases (www.lahey.org/studies/inc_webt.html).

La lutte contre la résistance aux β-lactamines peut se faire suivant plusieurs approches entre autre, l'utilisation des antibiotiques non β-lactamines et des β-lactamines stables aux β-lactamases. Pour ce qui est des β-lactamines stables aux β-lactamases, la sémi-synthèse de

certaines molécules dans années 1960 à partir de l'acide 6-amino-penicillanique a permis de mettre sur le marché de nouvelle molécule (isoxasolyl pénicillines, méthicilline, nafcilline) qui ont la capacité de résister à l'action hydrolytique de la pénicillinase de *Staphylococcus aureus*. Dans les années 1970, l'acide olivanique (carbapénème) et l'acide clavulanique produits respectivement par *Streptomyces olivacens* et *S. clavuligerus* ont été découvertes. La première molécule a montré une activité antibactérienne certaine alors que l'acide clavulanique ayant montré une faible activité antibactérienne s'est révélé être un inhibiteur potentiel des β -lactamases plasmidiques des bactéries à Gram positif et négatif et des β -lactamases chromosomiques de *K. pneumoniae*, *Proteus* spp., *Bacteroides fragilis*. Depuis ce temps, d'autres molécules de β -lactamines résistantes à l'hydrolyse des β -lactamases ont été découvertes chez les microorganismes ou sémi-synthétisées. C'est le cas par exemples des céphalosporines avec les β -oxyimino-céphalosprines (cefotaxime, ceftriaxone, ceftazidime, céfépime), des céphamycines avec les méthoxy- β -lactamines (céfoxitine, céfotétan), monobactame (aztréoname), carbapénème (imipénème, méropénème, ertapénème) ou des inhibiteurs suicides comme les pénicillines sulphones (sulbactame, tazobactame), de l'acide 6- β -halogeno pénicillanique et les analogues des stades de transitions (boronates et phosphonates) (Figure 6) (Rolinson, 1991 ; Therrien, 1998).

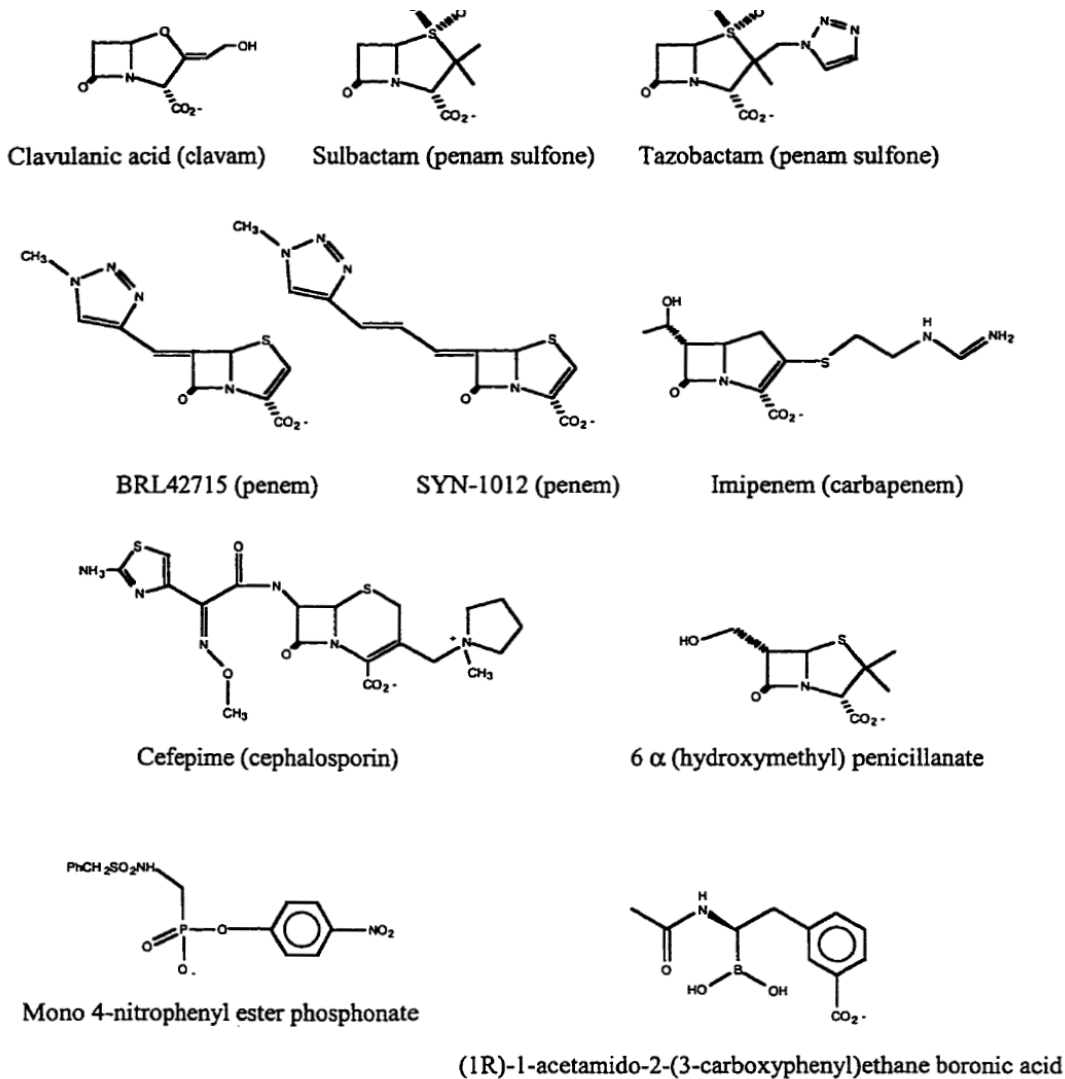


Figure 6 : Structure des β -lactamines et analogues du stade de transition qui ont une activité inhibitrice sur les β -lactamases à sérine active (Therrien, 1998).

L'approche thérapeutique la plus utilisée en clinique est l'utilisation de la combinaison des inhibiteurs suicides des β -lactamases avec les pénicillines. La première utilisation de cette combinaison se situe dans les années 1980 où un réel succès avait été noté dans le traitement des infections causées par les bactéries productrices de β -lactamases. L'acide clavulanique et d'autres composés sémi-synthétiques (sulbactame et tazobactame) sont des inhibiteurs potentiels des β -lactamases à sérine active de la classe A. Ces inhibiteurs ont un même mécanisme d'inhibition (Figure 7) et ont été utilisés avec succès en combinaison avec les pénicillines (amoxicilline/acide clavulanique, ampicilline/sulbactame, pipéracilline/tazobactame). Ces combinaisons inhibent la croissance des bactéries produisant les β -lactamases de la classe A (classe fonctionnelle 2) telles les enzymes du type TEM et SHV qui sont généralement des β -lactamases à médiation plasmidiques des bacilles à Gram

négalif. Aujourd'hui, comme signalé plus haut, à la classe A des β -lactamases on ajoute la classe C, les mégallo- β -lactamases et certaines enzymes de la classe D qui ne sont du tout pas inhibées par ces inhibiteurs. Bien plus les bactéries produisant plusieurs β -lactamases de la classe A sont résistantes à l'action des combinaisons (Bush *et al.*, 1995 ; Bush, 2002 ; Miller *et al.*, 2001; She & Liu, 2002 ;Yang, 1998).

Depuis plus d'une vingtaine d'années, des études ont été menées pour la recherche des inhibiteurs plus efficaces et ayant une bonne activité sur toutes les classes de β -lactamase. Plusieurs inhibiteurs ont été proposés entre autres les composés dérivant des pénèmes (BRL-42715, 6-méthylidene pénème), les dérivés des céphalosporines, le monobactame Syn 2190, les composés non- β -lactamines (dérivés de l'acide boronique, rhodamines, acyl phosphonates, AVE 1130A), les analogues et les dérivés de la protéine inhibant la β -lactamase (BLIP). Ces différents composés peuvent inhiber les enzymes de la classe A, C et de la classe B (acide picolinique, acide succinique, l'acide mercapto-carboxylique) (Hyodo *et al.*, 1997 ; Farmer *et al.*, 1994 ; Phillips *et al.*, 1997 ; Huang *et al.*, 2000 ; Weiss *et al.*, 2004 ; Nishida *et al.*, 1999 ; Bonnefoy *et al.*, 2004 ; Concha *et al.*, 2000 ; Mollard *et al.*, 2001 ; Toney *et al.*, 2001). Ces inhibiteurs inhibent aussi les enzymes essentielles à sérine active des mammifères et les mégallo- β -lactamases non-bactériennes. Bien plus ces inhibiteurs sont non stables et ont une faible pénétration au niveau de la membrane des bactéries à Gram-négatif. Le problème demeure alors entier et la recherche de cet inhibiteur miracle continue.

Au début des années 1990, de nouvelles β -lactamases, conférant la résistance à l'inhibition par l'acide clavulanique ont été mises en évidence en France. L'analyse de la séquence de ces enzymes a révélé qu'elles sont une variante des β -lactamases du type TEM et dérivent par mutation de TEM-1 ou TEM-2. Ces enzymes avaient été dénommées IRT (Inhibitor-Resistant TEM) et ont par la suite été renommées suivant la nomenclature des enzymes du type TEM. Les IRT dérivent des β -lactamases TEM par mutations aux positions 69, 244, 275 et 276. Les bactéries productrices de ces enzymes sont résistantes aux combinaisons amoxicilline/acide clavulanique, ticarcilline/acide clavulanique, et ampicilline/sulbactame et demeurent sensibles à la combinaison pipéracilline/tazobactame. Plus d'une quinzaine de ces enzymes ont été décrites et elles ont le plus été isolées de *E. coli*. Toutefois ces β -lactamases ont été isolées de *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *P. mirabilis* et *Citrobacter freundii*. En plus de la France où la présence de ces enzymes a été notée, il faut ajouter la Grèce et le Royaume Uni (Bradford, 2001).

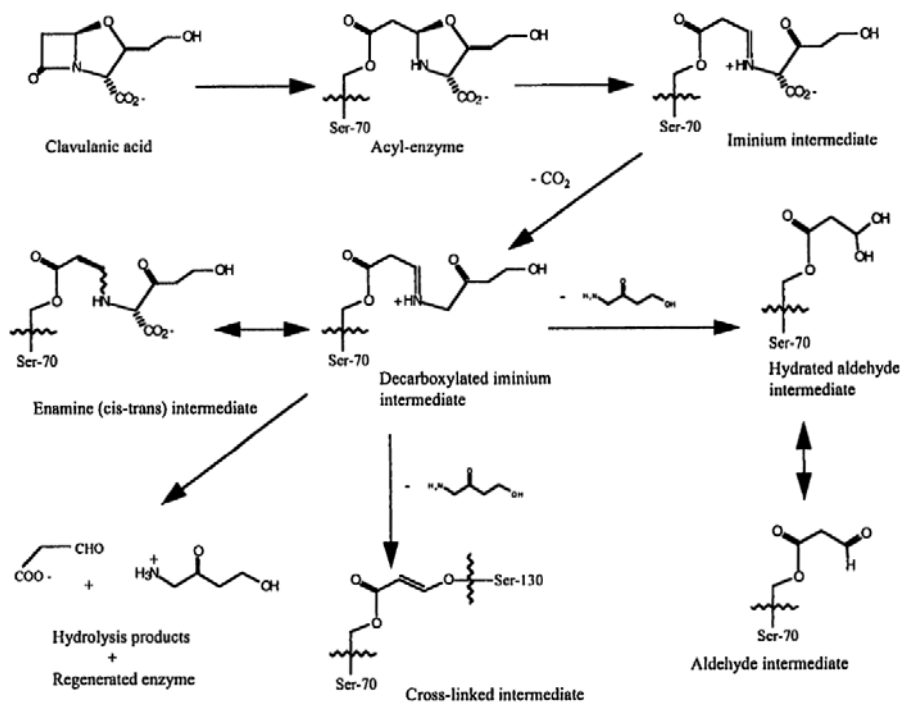


Figure 7 : Proposition de mécanisme d'inactivation des β -lactamases de la classe A par l'acide clavulanique (Thérrien, 1998).

I.6. Les plantes en Médecine

Les plantes constituent pour l'homme et les animaux une source des aliments tant structuraux que fonctionnels. Elles renferment aussi de nombreux principes actifs employés comme médicaments. Rechercher le pouvoir de guérison des plantes est une ancienne idée. Depuis la préhistoire, plus d'une centaine ou milliers de plantes ont été utilisées dans le monde entier sous forme de cataplasme ou d'infusion. En Irak depuis le Neanderthal jusqu'aujourd'hui on utilise la rose (*Alcea rosea* L.) en ethnomédecine (Cowan, 1999). L'encens (*Boswellia sacra* L.) et la myrrhe (*Commiphora myrrha* L.) ont été utilisés dans la Bible pour le bain de bouche (gargarisme) du fait de leurs propriétés antiseptiques. Plusieurs espèces de plantes sont utilisées comme médicaments. Il a été rapporté que les natifs américains ont utilisé 2564 espèces de plantes comme médicaments. Les plantes médicinales et aromatiques sont largement utilisées en Albanie, Bulgarie, Croatie, France, Allemagne, Hongrie, Espagne, Turquie et Royaume Uni (Cowan, 1999). Au Cameroun les travaux d'Adjanohoun *et al.*, (1996) et Betti (2004) ont montré que les plantes médicinales sont aussi très utilisées dans le traitement de plusieurs maladies.

La majorité de la population mondiale (75%) représentant la tranche la plus pauvre utilise les plantes pour subvenir à ses besoins de santé primaire, malgré l'existence des médicaments synthétiques (Duke, 1990). En Afrique, plus de 80% de la population utilisent les plantes médicinales dans le traitement des maladies graves. Au Ghana, Mali, Nigeria et en Zambie par exemple, les plantes médicinales constituent le traitement de première intention pour plus de 60 % des enfants atteints de forte fièvre due au paludisme. En Chine les préparations traditionnelles à base de plantes représentent entre 30 et 50 % de la consommation totale de médicaments. En Europe, en Amérique du Nord et dans d'autres régions industrialisées, plus de 50 % de la population a eu recours au moins une fois à la médecine complémentaire ou parallèle. A San Francisco, à Londres et en Afrique du Sud, 75 % des personnes vivant avec le VIH ou le SIDA font appel à la médecine traditionnelle ou à la médecine complémentaire ou parallèle. Environ 70 % des Canadiens ont eu recours au moins une fois à la médecine complémentaire (OMS, 2002).

Cette ruée vers la médecine par les plantes peut s'expliquer par le fait que les plantes sont disponibles partout et c'est une médecine qui est abordable surtout dans les pays en voie de développement (OMS, 2002). De plus, les effets secondaires causés par les plantes sont minimes voire absent au contraire des médicaments sémi-synthétiques (Iwu, 1999 ; Cowan, 1999).

Le pouvoir de guérison des plantes provient de leurs métabolites secondaires. Ces métabolites interviennent dans la défense contre les pathogènes, les prédateurs ou tout simplement dans la pollinisation et la dissémination des graines de la plante. On distingue plusieurs groupes entre autres les phénols (simples phénols, acides phénoliques, quinones, flavonoïdes, flavones, flavonols, tannins et les coumarines), les alcaloïdes, les terpénoïdes, les lectines et polypeptides. Quelques uns de ces composés sont représentés à la figure 8. Cowan (1999) a fait une bonne revue sur ces composés en mettant en exergue leur activité biologique surtout antimicrobienne. Le mécanisme d'action de ces composés passe par la désorganisation de la membrane plasmique, la formation des complexes avec la paroi, l'inhibition des enzymes, l'interaction avec l'ADN (Tableau 3) (Cowan, 1999). Parmi ces différents composés secondaires, il serait intéressant de rechercher l'activité sur les β -lactamases des composés dont le mécanisme d'action passe par l'inactivation des enzymes comme les phénols. Peut-être que l'inhibiteur miracle efficace et stable au niveau pharmacologique de ces β -lactamases viendrait des plantes.

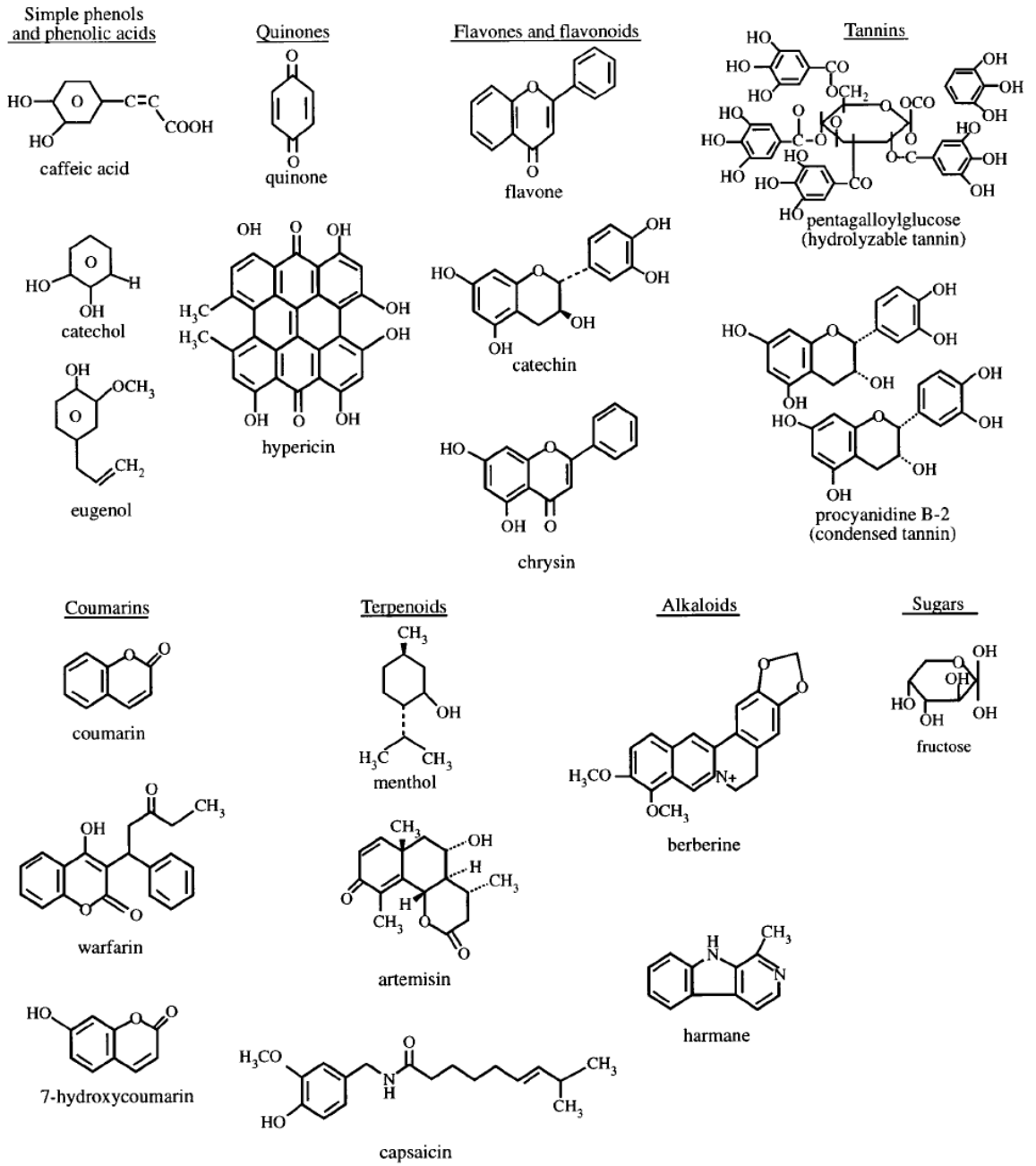


Figure 8 : Structure chimique des composés antimicrobiens des plantes (Cowan, 1999)

Tableau 3 : Classe majeure de composés antimicrobiens des plantes et mécanisme d'action (Cowan, 1999)

Class	Subclass	Example(s)	Mechanism
Phenolics	Simple phenols	Catechol Epicatechin	Substrate deprivation Membrane disruption
	Phenolic acids	Cinnamic acid	
	Quinones	Hypericin	Bind to adhesins, complex with cell wall, inactivate enzymes
	Flavonoids	Chrysin	Bind to adhesins
	Flavones	Abyssinone	Complex with cell wall Inactivate enzymes Inhibit HIV reverse transcriptase ?
	Flavonols	Totanol	Bind to proteins
	Tannins	Ellagitannin	Bind to adhesins Enzyme inhibition Substrate deprivation Complex with cell wall Membrane disruption Metal ion complexation
	Coumarins	Warfarin	Interaction with eucaryotic DNA (antiviral activity)
Terpenoids, essential oils		Capsaicin	Membrane disruption
Alkaloids		Berberine Piperine	Intercalate into cell wall and/or DNA
Lectins and polypeptides		Mannose-specific agglutinin Fabatin	Block viral fusion or adsorption Form disulfide bridges
Polyacetylenes		8S-Heptadeca-2(Z),9(Z)-diene-4,6-diyne-1,8-diol	?

I.7. Les plantes étudiées

Nous avons sélectionné deux plantes à cause de leurs propriétés médicinales et de leur large utilisation par les populations du Sud Cameroun.

I.7.1 *Bridelia micrantha* (Hochsh) Baill.

Bridelia micrantha (Euphorbiaceae) est un arbre de taille moyenne (18 m), à feuilles caduques, assez denses, étalées avec des couronnes plutôt rondes. La tige est relativement longue et nue, devenant lisse et pâle ou gris presque noir quand elle vieillit. L'écorce s'écaille, se fend en des endroits, formant de petites cavités. Elle est brun noir ou gris.

Les feuilles sont simples et arrangées symétriquement et alternativement sur les jeunes brindilles. Leur taille varie énormément et elles ont une texture rugueuse et sont oblongues. Leur surface supérieure est vert-foncée et glacée et lisse. Eventuellement, elles virent au rouge lumineux à brun-rougeâtre. On y note des tâches brunes.

Les fleurs apparaissent en petits groupes axillaires contenant les fleurs mâles et femelles. Les fleurs mâles sont portées par un court pédicules (1-2 mm de longueur), sont triangulaires avec des pétales plus courts que les sépales et ayant 1,5 à 2 mm de longueur. Les

fleurs femelles sont sessiles. Quelque soit le sexe, les fleurs sont de très petites tailles, pâle au jaune-vert. Les fleurs mâles et femelles sont séparées et apparaissent sur le même arbre.

Les fruits apparaissent aussi en groupe, sont sub-ovoïdes à ellipsoïdes avec environ 8 mm de longueur et 5-8 mm de diamètre, et contenant chacun une graine. Leur mésocarpe est épais et leur peau lisse devient noir-ébène quand ils sont mûrs.

Le bois est dur et un peu lourd. L'aubier est brun-chamois et le duramen brun. La texture est fine. Il est résistant aux termites. La figure 9 illustre l'arbre, une brindille avec les feuilles et les fruits

(http://www.fao.org/documents/show_cdr.asp?url_file=//docrep/x53272e/x5327e09.htm;
<http://www.worldagroforestrycentre.or/Sites/TreeDBS/Aft>;
<http://library.thinquestafrica.org/TQA00198/index.html>).

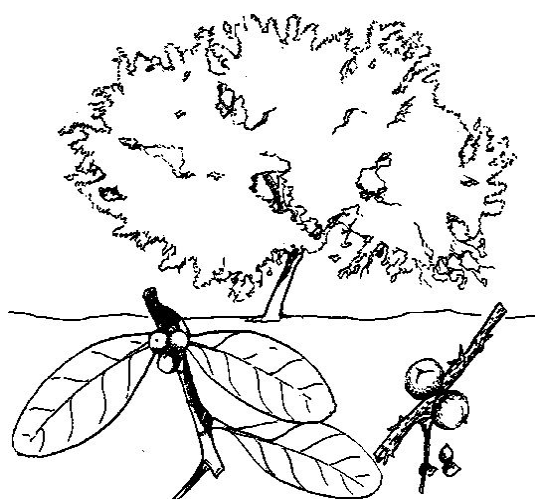


Figure 9 : *Bridelia micrantha* (arbre, feuilles, fruits)

(http://www.fao.org/documents/show_cdr.asp?url_file=//docrep/x53272e/x5327e09.htm)

L'aire de répartition géographique est l'Afrique tropicale et australe. Cette espèce se trouve en forêts, le long des rivières ou fleuves, au bord des forêts boisées, dans les forêts secondaires, galeries, et même en Savane. Elle se trouve généralement à une altitude en dessous de 2500 m.

Le bois est utilisé pour la construction, pour les meubles de maison et comme bois de chauffage. Les fruits sont comestibles.

B. micrantha est antidiarrhéique et antimicrobien (Abo et Ashidi, 1999 ; Lin *et al.*, 2002 ; Samie *et al.*, 2005). L'infusion de l'écorce est utilisée pour les maux des yeux, d'estomac, la dysenterie, contre le ténia. Elle est aussi utilisée comme substance tonique. Les racines sont utilisées pour traiter les allergies, la gonorrhée, les maux de têtes, le prolapsus du

rectum. *B. micrantha* est aussi utilisée dans les mises bas, la douleur de la délivrance, la dystocie, l'accouchement difficile

(http://www.fao.org/documents/show_cdr.asp?url_file=/docrep/x53272e/x5327e09.htm;
<http://www.worldagroforestrycentre.or/Sites/TreeDBS/Aft>;
<http://library.thinquestafrica.org/TQA00198/index.html>).

Les composés chimiques déjà mis en évidence dans *B. micrantha* sont constitués de friedeline, taraxerone, epifriedelinol, taraxerol (Pegel & Rogers., 1968; Kouam *et al.*, 2005)

I.7.2. *Garcinia lucida* Vesque (Clusiaceae)

Garcinia lucida est un petit arbre de hauteur variant de 12-15 m. Le diamètre maximal observé à hauteur de poitrine est inférieur à 30 cm. La base des arbres est cylindrique ou surélevée au-dessus du sol par 4 à 6 racines échasses verticales, simple ou ramifiées. Le tronc est rectiligne et le fût cylindrique. L'écorce est verruqueuse ou rugueuse, d'épaisseur variable et au goût amer. La teinte est uniforme ou marbrée (Guedje, 2002).

Le houppier est constitué de branches plus ou moins horizontales en goupillon sur toute la hauteur de la tige et plus resserrées vers le haut. Les feuilles sont pendantes et sont persistantes, simples, opposées et sans stipules. Elles sont elliptiques ou oblongues et coriaces. Le limbe, vert doré sur la face inférieure et à base plus ou moins arrondies ou obtuse est entier.

Les inflorescences sont soit en glomérules terminaux ou axillaires, soit en racème terminal ou axillaire, simple ou ramifié atteignant parfois 100 cm de longueur. Les pieds males sont différents des pieds femelles. Les fleurs sont unisexuées et tétramères. Elles sont petites, de couleur blanche et mesurent entre 6 et 8 mm de diamètre. Les fruits, de forme ellipsoïdale ou globuleuse, sont de couleur verte à vert-dorée. Ils mesurent 13 x 11 cm. L'épicarpe est parfois lisse ou muni d'excroissances ou de protubérances. Ces fruits contiennent une à 4 grosses graines semi ellipsoïdes, au goût amer, de couleur violet-rougeâtre à maturité. L'enveloppe est mince et ridée transversalement. La figure 10 illustre un fragment de rameau, le fruit et la graine de *G. lucida* (Guedje, 2002).

G. lucida est trouvée dans le domaine guinéo-congolais. Son aire de répartition en Afrique couvre le Cameroun, la guinée équatoriale et le Gabon.

La graine de *G. lucida* est comestible. L'écorce de la tige est utilisée comme adjuvant lors de la production du vin de palme.

G. lucida est très utilisée dans la médecine traditionnelle pour soigner diverses affections gastro-intestinales (diarrhée, coliques abdominales, ballonnement, indigestion), gynécologiques, infections sexuellement transmissibles et ulcères gastriques (Guedje, 2002). Cette espèce est aussi utilisée comme contre poison. La graine est conseillée dans le traitement des morsures de serpents (Chippaux *et al.*, 1997).

Les biflavonoïdes, les anthocyanes, des saponines, des glucides, des triterpènes et des dérivées de cycloartane ont été isolés des graines et écorce de *G. lucida* (Nyemba *et al.*, 1990, Guedje, 2002).

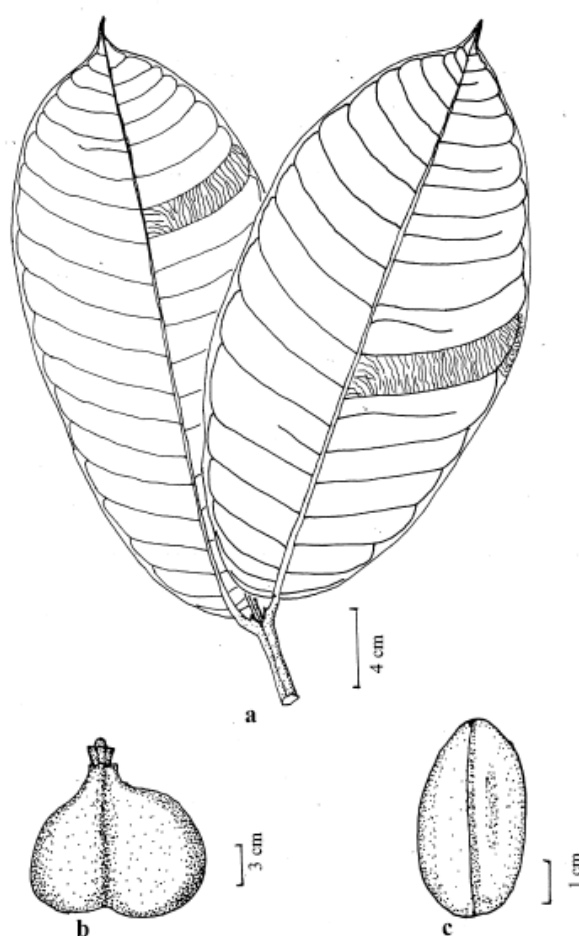


Figure 10 : *Garcinia lucida* Vesque, Feuilles (a), fruits (b) et graine (c) (Guedje, 2002).

CHAPITRE II
MATÉRIEL ET METHODES

CHAPITRE II. MATERIEL ET METHODES

II.1. Souches bactériennes

Au total 267 souches bactériennes appartenant à la famille des Entérobactéries ont été isolées de divers produits pathologiques (urine, pus et sang) provenant des patients hospitalisés de l'Hôpital Central de Yaoundé (HCY). Ces souches ont été isolées en deux périodes (Tableau 4) :

- la première qui va d'avril 1995 à mars 1998 (3 années) pendant laquelle toutes les souches d'entérobactéries résistantes ou non aux céphalosporines de 3^{ème} génération ont été incluses dans l'étude. Cette période a permis d'isoler 259 souches ;
- la seconde période va de juillet à novembre 2002 où seulement les souches résistantes aux oxyimino-céphalosporines ont été prises en considération (8 souches).

Toutes les souches ont été identifiées par les méthodes conventionnelles (Farmer, 1999) et confirmées par la galerie API 20 E (bioMérieux, France). Seulement une souche par patient a été prise en considération dans cette étude. Le tableau 5 donne les autres souches utilisées.

Tableau 4 : Souches cliniques étudiées

Souches bactériennes	Période		Total
	1995-1998	2002	
<i>Escherichia coli</i>	91	4	95
<i>Klebsiella</i> spp.	64	2	67
<i>Proteus</i> spp.	56	/	56
<i>Enterobacter</i> spp.	31	2	33
<i>Citrobacter</i> spp.	17	/	17
Total	259	8	267

Tableau 5 : Caractéristiques des autres souches utilisées

Souche <i>E. coli</i>	Caractéristique ^a	Utilisation
HK 225	Lac ⁻ , Rif ^r , Stp ^r	Réceptrices pour expériences de conjugaison
K1226R790	Lac ⁻ , Rif ^r	
K1214R519	Lac ⁻ , Nal ^r	
K121R716	Lac ⁻ Stp ^r	
DH5 α	Lac ⁻	Transformation
ATCC 25922	Lac ⁺	Contrôle sensibilité aux antibiotiques, témoin négatif expériences de PCR
pMPA	Lac ⁻ , <i>bla</i> _{SHV-2a}	Témoin positif gène <i>bla</i> _{SHV} pour expériences de PCR
K12R111	Lac ⁺ , <i>bla</i> _{TEM}	Témoin positif gène <i>bla</i> _{TEM} pour expériences de PCR
ptrcTzan27	Lac ⁻ , <i>bla</i> _{CTX-M}	Témoin positif gène <i>bla</i> _{CTX-M} pour expérience de PCR

^a Lac, lactose ; Rif^r, rifampicine résistante ; Stp^r, Streptomycine résistante ; Nal^r, Acide nalidixique résistante ;

II.2. Sensibilité aux antibiotiques et détection des BLSE

La sensibilité aux antibiotiques a été déterminée par la méthode des disques suivant les recommandations du CLSI (1999) en utilisant les disques d'antibiotiques de BBL Microbiology System (Cockeysville, Md.). Les antibiotiques testés ont été l'amoxicilline, l'amoxicilline/acide clavulanique, ticarcilline, ticarcilline/acide clavulanique, pipéracilline, céfazoline, céfoxitine, céfotaxime, ceftazidime, cefpirome, cefépime, aztréoname, imipénème, amikacine, gentamicine, ciprofloxacine, norfloxacine, ofloxacine, triméthoprime/sulfaméthoxazole.

Le test de double synergie (Jarlier *et al.*, 1988) a été utilisé pour la détection des souches cliniques et transconjugantes productrices de BLSE. Ce test consiste à disposer autour d'un disque d'amoxicilline/acide clavulanique ou de ticarcilline/acide clavulanique sous forme de croix les disques de céfotaxime, ceftazidime, ceftriaxone et aztréoname sur la gélose Mueller-Hinton (Difco Laboratories, Detroit, MI). La distance entre les disques centre à centre est comprise entre 15 et 19 mm (Figure 11). Ce test est réalisé lorsque la souche est

catégorisée résistante ou intermédiaire aux céphalosporines de troisième génération (céfotaxime, ceftazidime, ceftriaxone) et/ou au monobactame (aztréoname). La présence d'une BLSE se traduit par l'apparition d'une synergie entre les disques des oxyimino- β -lactamines et le disque contenant l'acide clavulanique. Cette synergie se matérialise par une image en forme de bouchon de champagne (effet potentialisateur de l'acide clavulanique).

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des souches ayant présenté un test de double synergie positif a été réalisé par E-test (AB Biodisk, Solna, Sweden) suivant les recommandations du fabricant.

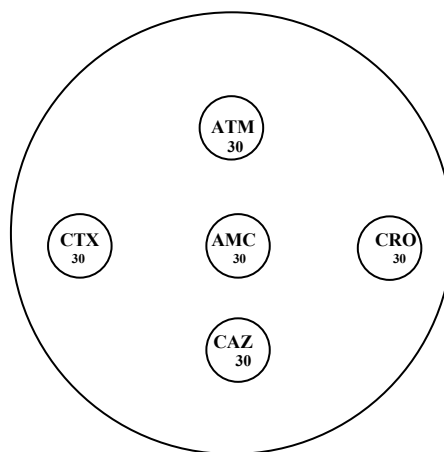


Figure 11 : Disposition des disques d'antibiotique pour le test de double synergie
ATM : Aztréoname ; CAZ : Ceftazidime ; CTX : Céfotaxime ; CRO : Ceftriaxone
30 représente la quantité d'antibiotique en μg dans le disque.

II.3. Caractérisation des souches productrices des BLSE

II.3.1. Transfert de gène de résistance

Le transfert du gène de résistance des β -lactamases à spectre élargi a été effectué par conjugaison et par transformation.

II.3.1.1. Expérience de conjugaison

Le mode de transfert génétique par conjugaison consiste en un transfert du matériel génétique (plasmide) par l'intermédiaire d'un pont cytoplasmique entre une bactérie donatrice et une bactérie réceptrice. Ce transfert nécessite un contact physique préalable entre bactérie de signes différents (bactérie réceptrice et bactérie donatrice). Les souches cliniques productrices de BLSE ont été utilisées comme souches donatrices et suivant ces souches, plusieurs souches réceptrices ont été utilisées (tableau 5).

Le transfert des gènes de résistances par conjugaison a été réalisé par la méthode en milieu liquide selon Philippon *et al.* (1983), utilisant comme milieu de culture le bouillon Luria -Bertani (LB) (Oxoid, Basingstoke, United Kingdom). A partir de la gélose Mc Conkey (Difco Laboratories, Detroit, MI), des colonies pures de 18 à 24 heures des souches réceptrices et donatrices ont été prélevées et ensemencées sur le bouillon cœur cerveau fraîchement préparé suivant les recommandations du fabricant. Sept millilitres de LB ont été ensemencés pour la souche donatrice et 20 ml pour la souche réceptrice. Les bouillons ainsi ensemencés ont été incubés à 37°C pendant 18 à 24 heures. L'incubation des souches réceptrices a été faite sous agitation.

Dans un erlenmeyer de 50 ml stérile les cultures en phase exponentielle des souches donatrice (1 ml) et réceptrice (4,5 ml) ont été mélangées et le mélange a été homogénéisé au vortex. Après avoir ajouté 4,5 ml de LB stérile, les cultures ont été incubées à 37°C pendant 4 heures. Une série de dilution avec l'eau physiologique (NaCl, 0,9%) de 10^{-1} à 10^{-6} a été préparée puis une quantité de 0,1 ml des dilutions 10^{-1} à 10^{-4} a été ensemencée sur gélose Mc Conkey contenant l'ampicilline (50µg/ml) et suivant la souche soit la streptomycine (500 µg/ml) et/ou la rifampicine (200µg/ml), soit l'acide nalidixique (100µg/ml) pour sélectionner les transconjugants. Des dilutions 10^{-5} et 10^{-6} ont été aussi ensemencées à raison de 0,1 ml par dilution sur Mc Conkey dépourvu d'antibiotiques. Les souches donatrices et réceptrices ont été ensemencées sur Mc Conkey avec antibiotiques pour le contrôle. Tous les milieux ensemencés ont été incubés à 37° C pendant 18 à 24 heures. Vingt-quatre heures après incubation les plaques ont été examinées et les colonies dénombrées.

Les souches tranconjugantes obtenues ont été identifiées et soumises à l'antibiogramme et au test de double synergie.

Le transfert des gènes de résistances par transformation n'a été réalisé que chez les souches cliniques dont le transfert par conjugaison n'a pas réussi.

II.3.1.2. Expérience de transformation

Le transfert de gène par transformation est très utile surtout en cas de plasmides non conjugatifs et non mobilisables (vecteur de clonage). L'expérience de transformation a été effectuée en utilisant la souche *E. coli* DH5α suivants les techniques standards (Sambrook *et al.*, 1989).

II.3.1.2.1. Préparation de cellules compétentes

Vingt cinq ml de LB ont été inoculés par une suspension de *E. coli* Dh5 α non compétentes conservées dans le glycérol. Cette préculture a été incubée à 37°C sous agitation orbitale pendant 18 à 24 heures. Elle a été utilisée pour ensemercer 500 ml de LB frais contenu dans un erlenmeyer de 2 litres. Le mélange a été ensuite incubé à 37°C sous agitation orbitale jusqu'à ce que la densité optique à 600 nm (OD_{600 nm}) atteigne une valeur de 0,6. Les cellules ont été centrifugées (centrifugeuse Sorvall RC-5B, Sorvall Instruments) pendant 10 minutes à 5000 g à 4°C. Le culot obtenu a été suspendu dans 50 ml d'une solution glacée de 0,1 M CaCl₂ et le tout a été placé sur la glace pendant 20 minutes. Après centrifugation à 4°C pendant 15 minutes, le culot a été dissous dans 21,5 ml d'une solution glacée de 0,1 M CaCl₂. Sept millilitres de glycérol 100% stérile ont été ajoutés et les cellules ont été distribuées par volume de 1 - 2 ml dans des cryotubes, puis congelées par le mélange carboglace-éthanol et conservées à -70°C.

II.3.1.2.2. Transformation de cellules compétentes

Les cellules compétentes ont été mises sur la glace et 0,2 ml ont été mélangées avec 200-500 ng de l'ADN sémipurifié des souches cliniques. Le mélange a été incubé pendant 30 mn sur la glace à la fin duquel il a subi un choc thermique à 42°C pendant 2 mn. Les souches ont été replacées sur glace pendant 2 minutes. Deux millilitres de bouillon LB sans antibiotiques préchauffé à 37°C ont été ajoutés au mélange. Ce dernier a été alors incubé à 37°C pendant une heure. Les cellules (0,2 ml) ont été enfin étalées sur boîtes de Petri de gélose ordinaire contenant l'antibiotique de sélection (ampicilline, 50 μ g/ml) et placées dans un incubateur à 37°C durant une nuit.

Après incubation, seules les cellules contenant le plasmide ont poussé sur la gélose LB contenant l'ampicilline. Les clones ainsi obtenus ont été repiqués et leur antibiogramme a été effectué pour s'assurer de la présence des gènes de résistance.

II.3.2. Extraction des β -lactamases

Les Entérobactéries résistantes aux β -lactamines par production d'enzymes inactivatrices, sécrètent des β -lactamases qui se localisent dans l'espace périplasmique et nécessitent pour être libérées la cassure de la paroi bactérienne. Les BLSE ont été extraites des souches cliniques, transconjugantes et transformantes en utilisant les ultrasons (El-Karsh *et al.*, 1995). A partir des colonies pures des souches obtenues sur la gélose ordinaire, 10 ml

de bouillon LB ont été ensemencés et incubés à 37°C pendant la nuit. Ce bouillon de culture a été utilisé pour ensemencer 150 ml du même milieu contenant les antibiotiques suivant : l'ampicilline (50µg/ml), la ceftazidime (10µg/ml), la céfotaxime (2µg/ml) et incubé à 37°C avec forte agitation dans un incubateur-agitateur (GFL) pendant 18-24 heures. Les cultures sont centrifugées à 4 500 x g à 4 °C en utilisant une centrifugeuse réfrigérée (Medifriger) pendant 20 minutes pour recueillir les cellules. Le surnageant est éliminé et le culot bactérien lavé deux fois avec 15 ml de tampon phosphate 0,1 M pH 7. Les cellules ont été resuspendues dans 1/50^e du volume initial dans le tampon phosphate 0,1 M pH 7.

La suspension cellulaire est soumise à des cycles (environ six) d'amplitude 10 - 11µm d'ultrasons (SONIPREP 150, United Kingdom) pendant 30 secondes à 0°C (dans un bac de glace) pour la cassure de la paroi bactérienne. Cette opération a été répétée 6 ou 7 fois à l'intervalle de 60 secondes pour s'assurer de la cassure du maximum des parois bactériennes. Le mélange obtenu a été soumis à une centrifugation à 8 000 x g pendant 30 minutes à 4°C. Le surnageant qui est l'extrait enzymatique brut a été recueilli et conservé à -20°C jusqu'à l'utilisation. L'activité des extraits bruts des BLSE a été évaluée visuellement par la nitrocéfine (céphalosporine chromogène) (0,2 mg/ml) (Oxoid, Basingstoke, UK). Cette évaluation visuelle permettra de choisir le volume d'enzyme à utiliser pour la détermination des points isoélectriques.

II.3.3. Isoélectrofocalisation

L'expérience d'isoélectrofocalisation a été réalisée sur gel de polyacrylamide contenant les ampholytes (gamme de pH 3,5 -9,5) (AP Biotech, Piscataway,NJ) suivant la méthode de Matthew *et al.* (1975) en utilisant l'appareil Bio-Rad 3000 Xi (Bio-Rad, USA). Après avoir réglé la température de la cuve de migration à 8° C le gel a été déposé sur la plaque millimétrée de la cuve. Les morceaux de papier filtre préalablement coupés (la dimension dépend du volume de l'extrait qui y sera déposé) ont été disposés sur le gel avec une distance de 1 cm entre eux et ont été imprégnés des extraits bruts de BLSE. Les volumes d'enzymes utilisés pour charger les papiers ont varié suivant l'activité enzymatique de 8 µl (forte activité visuelle) à 12 µl (faible activité). Les électrodes ont été inondées des solutions appropriées (H₃PO₄, 1M pour l'anode et NaOH, 1M pour la cathode) et placées de part et d'autre du gel. Après avoir mis en place le couvercle de la cuve, les électrodes ont été branchées au générateur. La puissance est réglée à 8 watt, la tension à 2000 mV et le courant à 75 mA. Les β-lactamases de points isoélectriques (pIs) connus TEM-1 (pI, 5,4), PSE-2 (pI, 6,1), SHV-1 (pI, 7,6), SHV-5 (pI, 8,2) et Lat-1 (pI, 9,4) ont été utilisées comme témoins.

L'activité des BLSE a été révélée après la migration (environ 1 h 30) des enzymes par la technique du zymogramme. Cette méthode consiste à déposer sur le gel un papier Whatmann imbibé d'une solution de nitrocéfine (0,2 mg/ml). La position de la β -lactamase sur le gel est marquée par l'apparition d'une bande rose ou rouge sur le papier due à l'hydrolyse de la nitrocéfine par l'enzyme sur le gel. La détermination approximative des pIs a été faite par comparaison aux pIs des enzymes témoins.

II.3.4. Hydrolyse des β -lactamines par les extraits bruts de BLSE

L'hydrolyse des β -lactamines par les BLSE a été étudiée suivant la méthode microbiologique selon Martinez-Martinez *et al.* (1996). Cette méthode a permis de noter le comportement des différentes BLSE contenues dans l'extrait enzymatique brut vis-à-vis des β -lactamines.

La souche *E. coli* HK 225 (Rif^r, Strep^r) sensible à tous les antibiotiques à l'exception de la rifampicine et la streptomycine a été utilisée pour la réalisation de l'antibiogramme par diffusion en gélose suivant les recommandations du CLSI (NCCLS, 1999). Les disques d'antibiotiques utilisés sont ceux d'amoxicilline, d'amoxicilline/acide clavulanique, de pipéracilline, de céfazoline, de céfoxitine, de ceftriaxone, de céfotaxime, de ceftazidime, aztréoname et d'imipénème.

Dix microlitres d'extrait enzymatique ont été utilisés pour imprégner le disque dès son application sur la surface de la gélose Mueller Hinton. Après application et imprégnation des disques, les boîtes sont incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures. L'activité des différents extraits a été déterminée par la mesure et la comparaison du diamètre de la zone d'inhibition des disques imprégnés d'extrait et du disque témoin (non imprégné). La réduction ou l'absence de zone d'inhibition autour d'un disque imprégné est une évidence de l'activité de la β -lactamase sur la β -lactamine.

II. 3.5. Extraction des ADN

L'ADN total des souches (transconjugantes, transformantes et cliniques) a été extrait des cultures en phase exponentielle selon le protocole utilisant le détergent hexadécyltriméthylammonium bromide (CTAB) décrit par Ausubel *et al.* (1994). Après extraction des acides nucléiques dans un tampon 2% (p/v) de CTAB et 1,4 M NaCl, les protéines ont été précipitées au chloroforme/octanol. L'ADN a été ensuite précipité sous forme d'un complexe avec le CTAB, complexe insoluble se formant quand la concentration en NaCl est réduite à 0,5 M. Ce complexe a été ensuite solubilisé, à des concentrations en sels

élevées, ce qui a permis de récupérer l'ADN et de le précipiter par de l'isopropanol. L'ADN total a été resuspendu dans le tampon Tris-EDTA (TE) (TrisHCL, 10 mM ; EDTA, 1mM) et conservé à -20°C.

L'ADN plasmidique des différentes souches a été extrait par lyse alcaline suivant le protocole de Sambrook *et al.* (1989). Cette méthode est basée sur le fait que le chromosome bactérien subit une dénaturation alcaline et précipite avec les protéines complexées par le Sodium Dodécyl Sulfate (SDS), alors que l'ADN plasmidique est renaturé et reste soluble. Un traitement à la RNase, au polyéthylène glycol et une extraction au phénol : chloroforme ont été réalisés pour une meilleure purification (élimination des ARN et des protéines). L'ADN plasmidique a été conservé comme l'ADN total dans le TE et placé à - 20°C.

II.3.6. Détection et amplification du gène BLSE

La PCR est une méthode qui permet l'amplification enzymatique ciblée d'un fragment d'ADN. Le cycle d'amplification comporte 3 étapes : la dénaturation de l'ADN double brin par la chaleur à 94°C, l'hybridation amorce-ADN et l'élongation. Cette dernière étape est catalysée par la Taq polymérase (ADN polymérase extrait des bactéries *Thermus aquaticus*). Chaque produit de la réaction d'élongation servant de matrice à la réaction suivante, une série de 30 cycles consécutifs conduit à l'accumulation exponentielle du fragment répliqué (Saiki *et al.*, 1985).

Les gènes *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *bla_{CTX-M}* et *bla_{OXA}* ont été amplifiés en utilisant des amorces spécifiques (Tableau 7) à partir de l'ADN total ou de l'ADN plasmidique et suivant plusieurs protocoles (tableau 6). Pour le gène *bla_{CTX-M}*, Les amorces CTX-MA et CTX-MB (température d'appariement, 54°C) qui correspond à la région conservée de *bla_{CTX-M}* ont été utilisées. La totalité de la région codante de *bla_{CTX-M-3}* a été amplifiée en utilisant les amorces CTX-MC et CTX-MD (température d'appariement, 58°C).

Les produits de PCR pour la détection du gène *bla_{SHV}* ont été digérés par l'enzyme de restriction *NheI* pour accroître la détection de ces gènes (Nuesch-Inderbinen *et al.*, 1996). Les amorces CTX-MA et CTX-MB ont été déterminées à partir de la séquence de CTX-M-3 (N° d'accèsion Genbank, Y10278).

Les réactions de PCR ont été effectuées dans un thermocycleur (Perkin Elmer Gene Amp PCR 2400) dans un volume réactionnel de 50 µl contenant 10 ng de l'ADN des souches ; 30 pmoles de chaque amorce; 10 mM de déoxynucléosides triphosphates (dTTP, dCTP, dGTP, dATP) ; 2,5 U de Taq DNA polymérase (Promega, Madison, USA) ; 1,5 mM de

MgCl₂ et 5 µl de 10 X tampon PCR (Promega, Madison, USA) suivant les protocoles du tableau 6.

Tableau 6 : Protocoles de PCR suivant le type de gène

Paramètre	Condition/durée			
	<i>bla_{TEM}</i>	<i>bla_{SHV}</i>	<i>bla_{CTX-M}</i>	<i>bla_{OXA}</i>
Dénaturation initiale	95°C/5 mn	95°C/5 mn	95°C/5 mn	95°C/5 mn
Dénaturation	94°C/30s	94°C/30 s	94°C/1mn	94°C/30 s
Appariement	52°C/30 s	68°C/30 s	54°C ou 58°C/1mn	58°C/30 s
Elongation	72°C /1 mn	72°C/1mn	72°C/2mn	72°C/1mn
Elongation finale	72°C/10 mn	72°C/10 mn	72°C/10 mn	72°C/10 mn
Nombre de cycle	30	30	35	30

II.3.7. Electrophorèse en gel d'agarose

Pour s'assurer de la purification des plasmides, de la qualité de l'amplification, de la digestion par les endonucléases et déterminer la masse moléculaire des fragments et plasmides, des électrophorèses ont été réalisées sur gel d'agarose de 0,8 à 1,5% en fonction de la taille du fragment d'ADN et sous une tension constante de 70 mV. Le tampon de migration utilisé a été le Tris-EDTA -Acétate (TEA) (Tris-HCL, 1,6mM, pH 8 ; EDTA, 4 µM ; Acétate de sodium, 1,6mM). La migration a été suivie grâce à une solution de dépôt [bleu de bromophénol 0,25% (p/v) ; xylène-cyanol 0,25% (p/v) ; EDTA 25 mM ; glycérol 50% (v/v)] ajoutée à la solution d'ADN à environ 20% du volume. Les différentes masses moléculaires des fragments et plasmides ont été déterminées en déposant à coté des puits contenant l'ADN des marqueurs de masses moléculaires. Pour les plasmides, le marqueur utilisé contient 4 plasmides de masse respectifs 4,2 ; 23,9 ; 42 et 98 mega daltons. L'évaluation de la taille des fragments après amplification ou digestion a été faite en utilisant le marqueur Gene Ruler 1 Kb DNA Ladder (MBI Fermentas, Vinius, Lithuma) (205-10000 bp). Après migration l'ADN a été observé sous UV grâce au bromure d'éthidium ajouté au tampon de migration (0,5 mg/ml).

II.3.8. Séquençage des gènes BLSEs

Les produits de la PCR ont été directement séquencés après purification par le kit nucleoSpin Extract (Macherey-Nagel, Germany). Les produits PCR comprenant les régions codantes des différents gènes ont été séquencés en utilisant les amorces suivantes : OT2R pour *bla_{TEM}*, SHV-R pour *bla_{SHV}*, CTX-MC pour *bla_{CTX-M-3}* et OXA-R pour *bla_{OXA}*. L'étude de l'environnement du gène CTX-M-15 a été réalisée en séquençant la région en amont de ce gène (amorce CTX-MR) et en aval (CTX-MF) sur le plasmide portant ce gène. L'amorce CTX-MR s'apparie à l'extrémité 5', à l'intérieur de la région codante. L'amorce CTX-MF s'apparie à l'extrémité 3' à l'intérieur de la région codante de CTX-M-15. Les amorces ISEcp1R et TnpAF ont été aussi utilisées pour le séquençage de l'amont (ISEcp1R) et de l'aval (TnpAF) de *bla_{CTX-M-15}*. Ainsi il sera possible de déterminer les différents types de structures géniques qui entourent le gène CTX-M-15.

Le séquençage des différents gènes a été réalisé en utilisant un séquenceur automatique ABI PRISM 377 (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, Calif.).

Les amorces CTX-M-R et CTX-M-F ont été déterminées à partir de la séquence de CTX-M-15 (N° d'accèsion AY044436). Toutes les amorces utilisées dans cette étude sont présentées au tableau 7.

Les différentes séquences obtenues ont été analysées avec les logiciels BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (disponible sur le site Internet du National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nih.gov>) et Gene Runner version 3,00.

II.3.9. Préparation des sondes d'ADN

Les sondes d'ADN utilisées dans l'expérience d'hybridation ont été préparées par PCR au cours de laquelle le Digoxigenin a été ajouté aux fragments de l'ADN. Le mélange réactionnel de 50µl contient 1µl de l'ADN plasmidique purifié, 20mM Tris-HCl (pH 8,8), 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl₂, 30 pmoles de chaque amorces (CTX-MA et CTX-MB), 0,2 mM de dATP, dGTP et dCTP, 0,19 mM deTTP, 0,01 mM de Digoxigenin-11-dUTP (Boehringer Mannheim). Les conditions de PCR ont été les suivantes : dénaturation initiale (95°C, 5 mn), 35 cycles comprenant la dénaturation (94°C, 1 mn), hybridation (54°C, 1 mn), et l'élongation (72°C (2 mn), l'élongation finale (72°C, 10 mn). Le produit de PCR de 550 bp obtenu constitue les sondes d'ADN.

II.3.10. Contenu des plasmides et hybridation

Les plasmide purifiés ont été digérés par l'enzyme de restriction *PstI* suivant les recommandations du fabricant (MBI Fermentas, Vinius, Lithuma).

Les fragments d'ADN ont été transférés sur le papier de nitrocellulose suivant la méthode de Southern (1975). L'hybridation a été réalisée dans les conditions les plus rigoureuses. L'expérience a été réalisée avec comme sondes les amplicons de PCR de 550 bp du gène CTX-M-3 dans lequel le digoxigenin-11-dUTP a été incorporé lors de l'amplification. La réalisation de l'hybridation et la détection immunologique des hybrides ont été faites suivant les recommandations du fabricant (Boehringer Mannheim), avec un lavage vigoureux du papier filtre après hybridation [2 fois dans 0,1 x SSC-0,1% SDS à 68°C (1x SSC : 0,15 M NaCl, 0,015 M citrate de Sodium)].

Tableau 7 : Amorces utilisées dans cette étude

Cible	Amorce	Séquence d'oligonucléotide (5'→3')	Position des amorces*	Orientation	Poids du produit (bp)	Référence
<i>bla_{TEM}</i>	OT1	TTGGGTGCACGAGTGGGTTA	187-201	Vers l'avant	467	Arlet et Phillipon, 1989
	OT2	TAATTGTTGCCGGAAGCTA	671-691	Vers l'arrière		
<i>bla_{SHV}</i>	SHV-F	CGC CGG GTT ATT CTT ATTTGT CGC	50-74	Vers l'avant	1017	Nüesch-Inderminen <i>et al.</i> , 1996
	SHV-R	TCT TTC CGA TGC CGC CGC CAG TCA	1034-1058	Vers l'arrière		
<i>bla_{CTX-M}</i>	CTX-MA	CGCTTTGCGATGTGCAG	202-218	Vers l'avant	550	Cette étude
	CTX-MB	ACCGCGATATCGTTGGT	736-752	Vers l'arrière		
<i>bla_{CTX-M-3}</i>	CTX-MC	ATGGTTAAAAAATCACTGCGCC	1-22	Vers l'avant	875	Mavroidi <i>et al.</i> , 2002
	CTX-MD	TTACAAACCGTCGGTGACGA	857-876	Vers l'arrière		
<i>bla_{OXA}</i>	OXA-F	GGCACCAGATTCAACTTTCAA	239-260	Vers l'avant	587	Cette étude
	OXA-R	TTTTTCTTGGCTTTTATGCTTG	814-835	Vers l'arrière		
Amont <i>bla_{CTX-M-15}</i>	CTX-MR	CGTAACTAATTGTGTCGT	151-168	Vers l'arrière	/	Cette étude
Aval <i>bla_{CTX-M-15}</i>	CTX-MF	CAACCACCACGGTATCGGT	723-741	Vers l'avant	/	Cette étude
Amont <i>bla_{CTX-M-15}</i>	ISEcp1R	TCGTATTTGGCTTCTTTG	158-141	Vers l'arrière	/	Cette étude
Aval <i>bla_{CTX-M-15}</i>	TnpA	GTATCGTGAATTTGCCTG	2043-2060	Vers l'avant	/	Cette étude
Amorce génotypique (ERIC-PCR)	ERIC-2	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG	/	Vers l'avant	/	Versalovic <i>et al.</i> , 1991

* Position comptée à partir du 1er nucléotide de la séquence entière.

II.3.11. ERIC-PCR

Le typage moléculaire des souches productrices de CTX-M a été réalisé par la méthode « Enterobacterial repetitive Consensus » (ERIC) en utilisant les amorces ERIC 2 (Versalovic *et al.*, 1991). Le mélange réactionnel de 50 µl de PCR pour chaque souche est constitué de 10 ng de l'ADN total des souches cliniques ; 100 pmoles de l'amorce ERIC2 ; 0,2 mM de désoxynucléosides triphosphate (dTTP, dCTP, dGTP, dATP) ; 0,5 mM MgCl₂ ; 2U de GoTaq DNA polymérase (Promega, Madison, USA) et 10 µl 5X tampon PCR (Promega, Madison, USA). Les conditions de ERIC-PCR ont été les suivantes : dénaturation initiale (95°C, 7mn) ; 35 cycles de dénaturation (94°C, 1 mn) ; appariement (45°C, 1 mn) ; élongation (72°C, 1 mn) et l'élongation finale (72°C, 10 mn).

II.3.12. Numéros d'accèsion des séquences

Les séquences nucléotidiques des gènes *bla_{SHV-12}* de *C. freundii*, *bla_{CTX-M-15}* de *E. coli* (deux gènes possédant des environnements différents) ont été déposés dans la banque des gènes (GenBank) avec les numéros d'accèsion respectifs AY940490, AY604721, AY604722.

II.4. Recherche d'inhibiteurs des β-lactamases dans les plantes médicinales

II.4. 1. Récolte des plantes

Le choix des plantes a été fait en se basant sur les informations ethnopharmacologiques (Adjanooun *et al.*, 1996 ; Guedje, 2002 ; Betti, 2004) et les propriétés antimicrobiennes [Abo et Ashidi, 1999 ; Lin *et al.*, 2002 ; Samie *et al.*, 2005 ; Gangoué Piéboji, 2002 (communication personnelle)].

Les différentes parties des plantes médicinales étudiées ont été récoltées dans la région de Yaoundé (Cameroun). Il s'agit de l'écorce de *Bridelia micrantha* (euphorbiaceae) et les fruits de *Garcinia lucida* (Clusiaceae) qui sont très utilisées dans la médecine traditionnelle pour le traitement de plusieurs maladies. Les différentes plantes étudiées ont été identifiées par des botanistes et des échantillons ont été placés à l'Herbier National du Cameroun.

II.4.2. Extractions des plantes

Le mélange méthanol/chlorure de méthylène (1/1) a été utilisé pour l'extraction du matériel végétal à froid suivant les procédés classiques. Les différentes extractions ont été effectuées dans les laboratoires de Chimie Organique de l'Université de Yaoundé I.

Le matériel végétal a été séché et écrasé. Environ 15 à 60 g de poudre ont été extrait avec 500 ml du mélange méthanol/chlorure de méthylène (1/1). L'extraction a été réalisée à la température ambiante sous agitation constante pendant 24 heures. Les extraits obtenus ont été filtrés et concentrés sous pression réduite pour le séchage et conservés à 4°C.

Pour l'étude de leur activité, les extraits de plantes ont été solubilisés dans du tampon phosphate 50 mM, pH 7 seul ou contenant le DMSO à 10% et le Tween 20 à 0,1% (v/v).

II.4.3. Les enzymes

Les enzymes utilisées ont été produites et purifiées dans les laboratoires du Centre d'Ingénierie des Protéines de l'Université de Liège suivant les méthodes décrites par Galleni & Frère (P99, 1988), Ledent *et al.* (OXA-10 ou PSE-2, 1993), Vanhove *et al.* (TEM-1, 1995) Laraki *et al.* (IMP-1, 1999). Ces enzymes appartiennent aux différentes classes des β -lactamases : A (TEM-1), B (IMP-1), C (P99) et D (OXA-10).

II.4.3. Elimination des tanins des extraits de plantes

Les extraits bruts de plantes ont été traités avec de la poudre de peau (Sigma) en vue d'enlever les tanins suivant la méthode préconisée par la pharmacopée européenne 4. Le mélange constitué de 10 mg d'extrait brut de plante, de 100 mg de poudre de peau et de 10 ml d'eau milliQ a été agité sur agitateur magnétique pendant une heure. Il a été ensuite centrifugé pendant 10 mn à 16000 g et filtré au filtre millipore 0.45 μ m. Le filtrat obtenu a été ensuite lyophilisé. La poudre obtenue a été pesée et dissoute dans le tampon phosphate 50 mM, pH 7 pour les tests d'activité sur les différentes enzymes.

II.4.4. Activité inhibitrice des extraits de plante sur les β -lactamases

L'activité des différentes β -lactamases a été déterminée en présence et en absence des extraits de plante. Les mesures ont été réalisées au lecteur Micoplaque Powerwave X (Biotek, UK) pendant au moins 30 mn à 482 nm. Les différents tests ont été réalisés avec du tampon phosphate 50 mM, pH 7. Le substrat utilisé a été la nitrocéfine (Oxoid, Ltd).

Les différents tests ont été effectués dans les plaques de microtitration et plusieurs concentrations en extrait de plante ont été testées au même moment. Le volume réactionnel a

été de 100 µl et constitué de l'extrait de plante, du tampon phosphate, de l'enzyme (10 µl) et de la nitrocéfine (500 µM) (10 µl). Les différentes concentrations d'enzymes utilisées ont été les suivantes : TEM-1 (0,65µg/ml), OXA-10 (0,96 ng/ml), IMP-1 (0,164 µg/ml) et P99 ($4,18 \times 10^{-4}$ nM).

Le mélange constitué d'extrait de plante, du tampon et de l'enzyme a été incubé à la température ambiante pendant 30 mn. Le substrat a été ajouté près du spectrophotomètre en commençant par le puits le plus concentré en extrait (6 µg/ml) pour finir dans le puits dépourvu d'extrait (témoin). Les vitesses initiales sont déterminées en UA/mn en tenant compte du pourcentage de substrat consommé (10%) et en utilisant le logiciel Excel (Microsoft office). L'activité résiduelle de l'enzyme a été déterminée en pourcentage à partir de l'activité de l'enzyme dans le puits témoin et suivant la formule $(V_{ie}/V_{it}) \times 100$, où V_{ie} est la vitesse initiale de l'enzyme dans le puits contenant l'extrait de plante et V_{it} l'activité de l'enzyme dans le puits témoin. Nous avons cherché à isoler le principe actif de ces deux extraits qui ont montré une forte activité inhibitrice sur P99 (*G. lucida*, AZ1) et OXA-10 (*B. micrantha*, AZ3).

II.4.5. Chromatographie Liquide Haute Performance

Dans l'optique d'isoler le principe actif des extraits AZ1 et AZ3 nous avons utilisé la chromatographie liquide haute performance (HPLC) pour fractionner ces extraits et purifier les différents produits. Nous avons réalisé tour à tour la chromatographie analytique et la chromatographie préparative.

II.4.5.1. Chromatographie liquide haute performance analytique

Le système que nous avons utilisé est Waters, Alliance 2695 muni d'un détecteur Photo Diode Array (PDA) Waters 996 (Milford, MA, USA). Les données de chromatographie ont été enregistrées et traitées par le logiciel Waters Millennium. Les analyses ont été réalisées en utilisant la colonne Symetry Shield RP18 (3.9x150 mm, 5µm, Waters, USA) et la colonne Licosphere 100 RP18e (4x 250 mm, 5µm, Merck, Germany). La température de la colonne a été de 30°C et celle de l'extrait 16°C. Le débit utilisé a été de 1 ml/mn. Le fractionnement chromatographique a été effectué en utilisant deux solvants : A (H₂O + acide phosphorique, pH 2,5) et B (acétonitrile). L'acide phosphorique a été remplacé parfois par le formiate d'ammonium à pH 2,5. Les changements de la colonne et du solvant A ont entraîné une modification des temps de rétention des différentes fractions. Toutefois, l'ordre de sortie n'a

pas été changé et les spectres U.V. des différentes fractions ont été les mêmes. La détection des différents produits a été faite à 290 nm et 270 nm pour les extraits AZ1 et AZ3 respectivement.

Tableau 8 : Gradient de réalisation de HPLC

A : Extrait AZ1

Temps (mn)	Solvant	
	A	B
0	88	12
20	78	22
22	20	80
25	20	80
26	88	12
30	88	12

B : Extrait AZ3

Temps (mn)	Solvant	
	A	B
0	94	6
20	84	16
25	74	26
30	44	56
32	20	80
34	20	80
35	94	6
40	94	6

Les solvants utilisés sont des solvants prévus pour la chromatographie liquide haute performance. Le solvant A a été préparé en utilisant l'eau milliQ. Il a été filtré sur un filtre millipore de 0.22 µm avant son utilisation.

L'extrait brut a été dissous dans du méthanol pur à une concentration de 10 mg/ml. La solution a été filtrée au filtre de 0.22 µm avant son utilisation. Le volume d'injection est variable. L'extrait brut traité avec la poudre de peau, c'est à dire dans lequel les tanins ont été

éliminés a été dissous dans du tampon phosphate à une concentration de 6 mg/ml. Il a été aussi filtré avant son utilisation.

Les fractions des différents extraits ont été recueillies et après passage au SpeedVac, lyophilisées. L'activité des différentes fractions a été déterminée en suivant le protocole décrit précédemment. Cette activité a été évaluée sur les enzymes P99 et OXA-10 pour respectivement les extraits AZ1 et AZ3.

II.4.5.2. Chromatographie liquide haute performance préparative

Pour la chromatographie liquide haute performance préparative, nous avons utilisé le système Waters PrepLC Controller DISO 439 muni d'un détecteur PDA Waters 996. La colonne utilisée est le modèle LC50.500.VE150 (NOVASEP, Belgique) avec comme phase C18 (kromasil 100Å, 10 µm). Le débit utilisé a été de 150 ml/mn. Les gradients utilisés ont été les mêmes que pour l'analytique avec comme solvant A (H₂O + formiate d'ammonium, pH 3) et B (Acétonitrile). Les extraits ont été dissous dans du méthanol et filtrés sur un filtre de 0,45 µm. Le volume d'injection est variable.

Les fractions collectées ont été concentrées au Buchi et lyophilisées. La pureté des fractions a été vérifiée par chromatographie analytique. Lorsque la fraction recueillie n'était pas pure, nous avons procédé à un second passage sur la colonne en respectant les mêmes conditions qu'au premier passage.

L'activité inhibitrice des produits purs a été déterminée sur les différentes enzymes, à savoir les produits purs de AZ1 sur P99 et ceux de AZ3 sur OXA-10. Suivant la pureté des produits et leur activité vis-à-vis des enzymes, certains produits ont été choisis pour des études spectroscopiques en vue de déterminer leur structure.

Ainsi la résonance magnétique nucléaire (RMN), le spectre de masse, et le spectre à infrarouge ont été effectués sur certains produits. Ces analyses ont été faites par le Centre de Recherches Cyclotron de l'Université de Liège. C'est dans les laboratoires de ce Centre que nous avons effectué la chromatographie liquide haute performance préparative.

II.5. Traitement des données

Les données ont été traitées par le logiciel WHONET 5 (World Health Organisation, Geneva, Switzerland).

CHAPITRE III
RÉSULTATS

CHAPITRE III. RÉSULTATS

III.1. Souches Bactériennes

Des 267 souches d'Entérobactéries étudiées, la majorité provient des urines (49,4%) et *E. coli* est l'espèce la plus fréquente (Tableau 9). Les différentes espèces qui ont été étudiées sont en plus *E. coli* (n=95), *Klebsiella pneumoniae* (n=65), *K. oxytoca* (n=1), *Proteus mirabilis* (n=42), *Morganella. morganii* (n=7), *P. rettgeri* (n=3), *P. alcalifaciens* (n=2), *P. vulgaris* (n=1), *Proteus sp.*, (n=1), *Enterobacter cloacae* (n=21) *E. aerogenes* (n=7), *Enterobacter sp.* (n=3), *Citrobacter freundii* (n=7), *C. diversus* (n=1), *Citrobacter sp.* (n=9).

Tableau 9 : Répartition des souches cliniques par produits pathologiques

Souches bactériennes	Produit pathologique			Total	%
	Urine	Pus	Sang		
<i>E. coli</i>	59	34	2	95	35,6
<i>Klebsiella spp.</i>	29	28	9	66	24,7
<i>Proteus spp.</i>	21	34	1	56	21,0
<i>Enterobacter spp.</i>	14	16	3	33	12,3
<i>Citrobacter spp.</i>	9	8	/	17	6,4
Total	132	120	15	267	
%	49,4	45,0	5,6	100	100,0

III.2. Sensibilité aux antibiotiques

En considérant comme souche résistante une souche non sensible, c'est-à-dire une souche catégorisée résistante ou intermédiaire, il ressort du Tableau 10 que la sensibilité globale des souches bactériennes isolées entre 1995-1998 montre une forte résistance aux pénicillines [amoxicilline (90%), la pipéracilline (79%)], à la céphalosporine de première génération (céfazoline, 75%) et au triméthoprimé/sulfaméthoxazole (73%). L'action de l'acide clavulanique n'a pas permis de restaurer l'activité de l'amoxicilline (32% de souches sensibles). La résistance des bactéries aux céphalosporines de 3^{ème} génération et monobactame varie de 12% (ceftazidime) à 23% (céfotaxime). Les antibiotiques les plus actifs sur ces souches ont été l'imipénème (100% de sensibilité) et l'ofloxacine (91%) et la cetazidime (88%) (Tableau 10).

Tableau 10 : Sensibilité des souches isolées entre 1995-1998 aux antibiotiques.

Nom de l'antibiotique	Valeurs critiques	Nombre de souches	Sensibilité (%) ^a			
			R	I	S	IC 95% (R)
Amoxicilline	14 - 17	259	88	2,3	9,7	83,3-91,6
Pipéracilline	18 - 20	259	71,8	8,1	20,1	65,8-77,1
Imipénème	14 - 15	259	0,0	0,0	100,0	0,0
Amoxicilline/ Acide clavulanique	14 - 17	259	34,4	33,6	32	28,7-40,6
Céfazoline	15 - 17	259	60,2	15,1	24,7	53,9-66,2
Céfoxitine	15 - 17	259	23,2	8,1	68,7	18,3-28,9
Céfotaxime	15 - 22	259	7,7	15,1	77,2	4,9-11,8
Ceftazidime	15 - 17	259	6,6	5,4	88	4,0-10,5
Aztréonam	16 - 21	259	10	10,8	79,2	6,8-14,5
Gentamicine	13 - 14	259	32	3,9	64,1	26,4-38,1
Ofloxacin	13 - 15	259	6,6	2,7	90,7	4,0-10,5
Triméthoprime/ Sulfaméthoxazole	11-15	259	71,4	1,9	26,6	65,4-76,7

^a R, résistant ; I, Intermédiaire ; S, Sensible ; IC95%(R), Intervalle de confiance à 95% pour les souches résistantes

III.3. Détection des BLSE

Des 267 souches d'Entérobactéries étudiées, 69 ont été résistantes à au moins une céphalosporine de 3^{ème} génération ou au monobactame. Parmi ces souches 38 ont été positives au test de double synergie, dont 31 isolées dans la période d'avril 1995 à mars 1998 et 7 en 2002. La prévalence des BLSE dans la première période est de 12% (31/259) en considérant l'ensemble des souches et de 50% (31/61) en ne prenant en compte que les souches résistantes aux oxyimino-céphalosporines. Ces souches présentant un phénotype BLSE ont été observées chez toutes les espèces d'Entérobactéries étudiées avec une forte prévalence chez *Klebsiella* spp. (18,8% ; *K. pneumoniae* [n=11] et *K. oxytoca* [n=1]) suivi de *Citrobacter* spp. (17,6%, *Citrobacter freundii* [n=3]) et *E. coli* (14,3%) (Tableau 11).

Des 38 souches productrices de BLSE, 22 ont été isolées des urines, 11 des pus et 5 du sang. Ces souches proviennent en majorité des patients hospitalisés dans les services de chirurgie (42,2%) et soins intensifs (36,8%) (Tableau 12).

Les valeurs des CMI des différentes souches ont été assez variables vis-à-vis des différents antibiotiques, mais les CMI de la ceftazidime ont été toujours $\geq 2\mu\text{g/ml}$. Toutes les souches ont été résistantes à l'amoxicilline, à la pipéracilline, et à la céphalotine et la plupart d'entre elles ont été résistantes à l'amoxicilline/acide clavulanique, gentamicine et au triméthoprime/sulfaméthoxazole. Les souches étudiées ont été toutes sensibles à l'imipénème et la plupart d'entre-elles ont été également sensibles au céfoxitine, ciprofloxacine et à l'amikacine (Tableau 12).

Tableau 11 : Prévalence du phénotype BLSE parmi les membres de la famille des Entérobactéries isolés de 1995-1998.

Organisme	Nombre total analysé	Nombre présentant le phénotype BLSE (%)
<i>Escherichia coli</i>	91	13 (14.3)
<i>Klebsiella spp.</i>	64	12 (18.8)
<i>Proteus spp.</i>	56	1 (1.8)
<i>Enterobacter spp.</i>	31	2 (6.5)
<i>Citrobacter spp.</i>	17	3 (17.6)
Total	259	31(12)

III.4. Transfert de résistance, analyse des plasmides et Hybridation

Parmi les 38 souches potentiellement productrices de BLSE 18 (47,4%) ont transféré la résistance des oxyimino-céphalosporines aux souches *E. coli* HK 225, K12 et DH5 α . Seize de ces gènes ont été transférés par conjugaison et deux par transformation. La transformation n'a été réalisée que chez les souches de 2002 qui ont présenté un phénotype particulier (très fortement résistantes au céfotaxime [CMI >256] et sensibles au ceftazidime [CMI=8]). Ce phénotype de résistance suggère la présence des souches productrices des BLSE du type CTX-M (Tzouvelekis *et al.*, 2000 ; Poirel *et al.*, 2001 ; Latrigue *et al.*, 2003). La suite de

l'étude a été réalisée sur les souches ayant transféré leur gène. Toutefois nous y avons adjoint une souche clinique *E. coli* YC-2 ayant présenté le phénotype ci-dessus. Le transfert de la résistance aux céphalosporines de 3^{ème} génération a été suivi du transfert de la résistance à la gentamicine et/ou au triméthoprimé/sulfaméthoxazole. Par contre le transfert de la résistance à la céfoxitine et aux fluoroquinolones n'a pas été observé (Tableau 13). Toutes les souches transconjugantes et transformantes ont montré un phénotype BLSE.

Les plasmides des souches transconjugantes, transformantes (*E. coli* DH5 α -HY5, *E. coli* DH5 α -HY6) et la souche clinique (*E. coli* YC-2) présentant un phénotype CTX-M ont été extraits et analysés. Il en ressort que :

- les souches transconjugantes (*E. coli* K1226R793-YC-14, *E. coli* K121R716-YC-17) hébergent chacune un large plasmide de type A d'environ 90 Kb ;
- la souche transformante (*E. coli* DH5 α -YC-5) contient un plasmide de type B ayant approximativement 50 Kb ;
- la souche transformante (*E. coli* DH5 α -YC-6) contient trois plasmides de taille d'environ 2, 4,2 et 10 Kb (le plasmide de 10 Kb serait celui qui porte le gène BLSE et est du type C);
- la souche clinique *E. coli* YC-2 hébergent deux plasmides, un grand (\approx 90 kb) et un petit (\approx 1 Kb).

Table 12 : Répartition des Entérobactéries présentant le phénotype BLSE par service hospitalier, produits pathologiques et sensibilité aux antibiotiques et points isoélectriques des différentes enzymes produites.

Organisme	Code	Service ^c	Produit pathologique	CMI (µg/ml) ^a de									Test synergie	Autres marqueurs de résistance ^b	Transfert gene BLSE	pIs
				Amx	Amc	Pip	Cfz	Fox	Ctx	Cro	Caz	Imp				
<i>Escherichia coli</i>	15/98	CHR	Pus	>256	32	>256	>256	32	16	32	6	0,19	+	Sxt	-	
	J51	CHR	Pus	>256	>256	>256	>256	8	3	4	8	0,125	+		-	5,4; 9,5
	J55	CHR	Pus	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	24	0,19	+	Gm, Sxt	+	5,4; 8,2; 8,7
	H302	SI	Blood	>256	16	>256	>256	3	4	3	4	0,125	+	Gm, Cip, Sxt	-	
	301/98	SI	Pus	>256	12	>256	>256	12	12	16	12	0,25	+	Gm, Cip, Sxt	-	
	424/97	GO	Urine	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	1,5	+	Gm, Amk, Sxt	-	
	J6	CHR	Urine	>256	16	>256	>256	3	2	3	32	0,125	+	Sxt	+	5,4; 8,2; 9
	268/98	SI	Urine	>256	24	>256	>256	12	12	16	32	0,125	+	Gm, Cip, Sxt	+	
	288/98	SI	Urine	>256	8	>256	>256	6	8	12	64	0,125	+	Cip, Sxt	+	5,4; 8,2; 9
	H304	SI	blood	>256	24	>256	>256	4	4	4	32	0,19	+	Gm, Cip, Sxt, Amk	-	5,4
	U349	SI	Urine	>256	12	>256	>256	3	48	48	96	0,125	+	Gm, Cip, Sxt	-	5,4; 8,2; 9,5
	508	CHR	Pus	>256	8	>256	>256	3	4	2	24	0,19	+	Gm, Sxt	-	5,4; 8,2; 9,5
	H281	SI	Sang	>256	8	>256	>256	1.5	3	2	16	0,19	+	Sxt	-	5,4
	YC-2	CHR	Urine	>256	16	>256	>256	16	>256	>256	12	0,25	+	Nor, Cip, Stx	-	5,4; 7,3; 8,8; 9,2
	YC-5	CHR	Urine	>256	32	>256	>256	8	>256	>256	24	0,125	+	Gm, Amk, Sxt, Nor, Cip	+	5,4; 7,3; 8,8; 9,2
	YC-14	SI	Urine	>256	32	>256	>256	8	>256	>256	16	0,25	+	Gm, Sxt	+	5,4; 7,3; 8,8; 9,2
	YCU-1	URO	Urine	>256	6	>256	>256	16	24	>256	6	0,19	+	Gm, ,	+	5,4 ; 8,2, 9,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	U229	SI	Urine	>256	16	>256	>256	3	48	32	>256	0,125	+	Gm, Sxt	+	5,4; 7,6; 8,2
	U271	CHR	Urine	>256	32	>256	>256	2	256	256	96	0,19	+	Gm, Sxt	+	5,4; 7,6; 8,2
	U284	CHR	Urine	>256	32	>256	>256	2	>256	>256	>256	0,19	+	Gm, Amk, Sxt	+	5,4; 7,6; 8,2
	J55	CHR	Pus	>256	16	>256	>256	6	16	12	64	0,19	+	Gm	+	5,6; 7,6; 8,2
	J51	CHR	Pus	>256	16	>256	>256	3	3	6	64	0,25	+	Gm, Sxt	-	

Suite tableau 12

Organisme	Code	Service ^c	Produit pathologique	CMI (µg/ml) ^a de									Test synergie	Autres marqueurs de résistance ^b	Transfert gene BLSE	pIs
				Amx	Amc	Pip	Cfz	Fox	Ctx	Cro	Caz	Imp				
<i>K. pneumoniae</i>	203cp	URO	Urine	>256	24	>256	48	3	1	2	12	0.25	+	Gm, Sxt	-	
	176cp	SI	Blood	>256	24	>256	>256	4	2	3	12	0.125	+	Gm, Sxt	-	
	J21	URO	Urine	>256	3	8	12	3	1	1.5	4	0.19	+	Sxt	-	
	083	SI	Blood	>256	12	>256	>256	3	2	2	3	0.125	+	Gm, Sxt	-	
	48/42	CHR	Urine	>256	16	>256	>256	96	24	32	32	0.125	+	Sxt	+	7,6; 8,2
	508	CHR	Pus	>256	24	>256	>256	3	16	32	6	0.19	+	Gm, Sxt	+	7,6; 8,2
	YC-6	URO	Urine	>256	16	>256	>256	4	>256	>256	6	0,125	+	Gm, Sxt	+	5,4; 5,6; 7,6; 8,4
	YC-17	SI	Urine	>256	16	>256	>256	6	>256	>256	128	0,19	+	Gm, Nor, Cip, Sxt	+	7,3; 8,8
<i>K oxytoca</i>	103	URO	Urine	>256	16	>256	>256	4	4	4	12	0.125	+	Gm, Sxt	-	5,4; 7,6
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1086	CHR	Pus	>256	24	>256	>256	96	1.5	3	16	0.19	+	Gm, Sxt	-	7,7; 8,2
<i>E. cloacae</i>	189	CHR	Urine	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	0.25	+	Gm, Sxt	+	5,4; 8,2; 9,5
<i>E. cloacae</i>	HY18	URO	Urine	>256	16	>256	256	>256	48	48	>256	0,19	+	Gm, , Sxt	+	7,6 ; 8,2 ; 9 ,2
<i>Citrobacter freundii</i>	09/98	SI	Pus	>256	48	>256	>256	>256	8	16	96	0.19	+	Gm, Sxt	+	5,4; 8,2 9,5
	J13	URO	Urine	>256	64	>256	>256	>256	12	16	32	0.19	+	Gm, Cip, Sxt	-	5,4; 8,5
	U271	CHR	Urine	>256	>256	>256	>256	93	96	96	64	0.125	+	Gm, Sxt	-	5,4; 8,5
<i>Proteus mirabilis</i>	294	SI	Pus	>256	8	>256	>256	1.5	4	8	8	0.125	+	Gm, Sxt	-	

^a Amx, amoxicilline; Amc, amoxicilline- acide clavulanique (2:1); Pip, pipéracilline; Cfz, céfazoline, Fox, céfoxitine; Ctx, céfotaxime; Cro, ceftriaxone; Caz, ceftazidime; Imp, imipénème.

^b Amk, amikacine; Gm, gentamicine; Cip, ciprofloxacine ; Sxt, trimethoprim/sulfamethozaxole.

^c SI, Soins Intensifs, URO, Urologie ; CHR, chirurgie ; GO, Gynécologie/Obstétrique

Tableau 13 : Caractéristiques des souches transconjugantes, transformantes et de la souche clinique *E. coli* YC-2

Organisme	Profil résistance antibiotiques ^a	<i>bla</i> gene				pI	β-lactamase type
		TEM	SHV	CTX-M	OXA		
<i>E. coli</i> Hk-225-U288	BLSE	-	+	-	-	8,2	SHV-12
<i>E. coli</i> Hk-225-J55E	BLSE, Gm	-	+	-	-	8,2	SHV-12
<i>E. coli</i> Hk-225-J6	BLSE	-	+	-	-	8,2	SHV-12
<i>E. coli</i> Hk-225-U268	BLSE, Gm	-	+	-	-	8,2	SHV-12
<i>E. coli</i> Hk-225-508K	BLSE, Gm	-	+	-	-	8,2	SHV-12
<i>E. coli</i> Hk-225-U229	BLSE, Sxt	-	+	-	-	8,2	SHV-12
<i>E. coli</i> Hk-225-48/42	BLSE	-	+	-	-	8,2	SHV-12
<i>E. coli</i> Hk-225-U271	BLSE, Gm, Sxt	-	+	-	-	8,2	SHV-12
<i>E. coli</i> Hk-225-U284	BLSE, GM, Sxt	-	+	-	-	8,2	SHV-12
<i>E. coli</i> Hk-225-J55K	BLSE, Gm	-	+	-	-	8,2	SHV-12
<i>E. coli</i> Hk-225-U189	BLSE, Gm	-	+	-	-	8,2	SHV-12
<i>E. coli</i> Hk-225-09	BLSE, Gm	-	+	-	-	8,2	SHV-12
<i>E. coli</i> K1226R793 YCU-1	BLSE, Gm,	+	+	-	-	5,4 ; 8,2 ; 8,5	SHV12, TEM-1
<i>E. coli</i> K1226R793508E	BLSE, Gm	+	+	-	-	5,4 ; 8,2 ; 8,5	SHV-12, TEM-1
<i>E. coli</i> DH5α-YC-5	BLSE, Gm, Sxt	+	-	+	+	5,4; 7,3; 8,8	TEM-1; OX- 30; CTX-M- 15
<i>E. coli</i> DH5α-YC-6	BLSE	-	-	+	-	8,4	CTX-M-1
<i>E. coli</i> K1226R793-YC-14	BLSE, Gm	-	-	+	+	7,3 ; 8,8	OXA-30 ; CTX-M-15
<i>E. coli</i> K121R716-YC-17	BLSE, Gm	-	-	+	+	7,3 ; 8,8	OXA-30 ; CTX-M-15
<i>E. coli</i> YC-2	BLSE, Sxt, Nor, Cip	+	-	+	+	5,4; 7,3; 8,8	TEM-1, OXA-30, CTX-M-15
<i>E. coli</i> Hk-225		-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> K12		-	-	-	-	-	-

^a BLSE, beta-lactamase à spectre élargi ; Gm, gentamicine ; Sxt, trimethoprim/sulfamethoxazole ; Nor, norfloxacin ; Cip, ciprofloxacine

La digestion des différents plasmides à l'exception de ceux de la souche (*E. coli* DH5 α -YC-6) par l'enzyme de restriction *Pst*I a montré des profils différents (Figure 12a). Le plasmide de la souche *E. coli* K1226R793-YC-14 (pHY-14a), et celui de la souche *E. coli* K121R716-YC-17 (pHY-17a) ont pratiquement le même profil. Par contre les plasmides des souches *E. coli* DH5 α -YC-5 (pYC-5b) et *E. coli* YC2 (pYC-2b) sont différents et différents des profils des autres plasmides. Le plasmide de petite taille de *E. coli* YC-2 n'a pas été digéré (Figure 12 a).

Hybridation par les sondes spécifiques de *bla*_{CTX-M} a montré que les gènes *bla*_{CTX-M} des souches *E. coli* YC-14 et *K. pneumoniae* YC-17 sont codés par le même fragment *Pst*I de 5,3 Kb de taille, alors que ceux des souches *E. coli* YC-2 et YC-5 sont codés par un fragment *Pst*I de taille 3,4 Kb (figure 12b).

De ces analyses il ressort que trois plasmides portent le gène *bla*_{CTX-M} dans les 4 souches étudiées. Les plasmides pYC-14a et pYC-17a sont identiques et différent des deux autres, pYC-5b et pYC-2a.

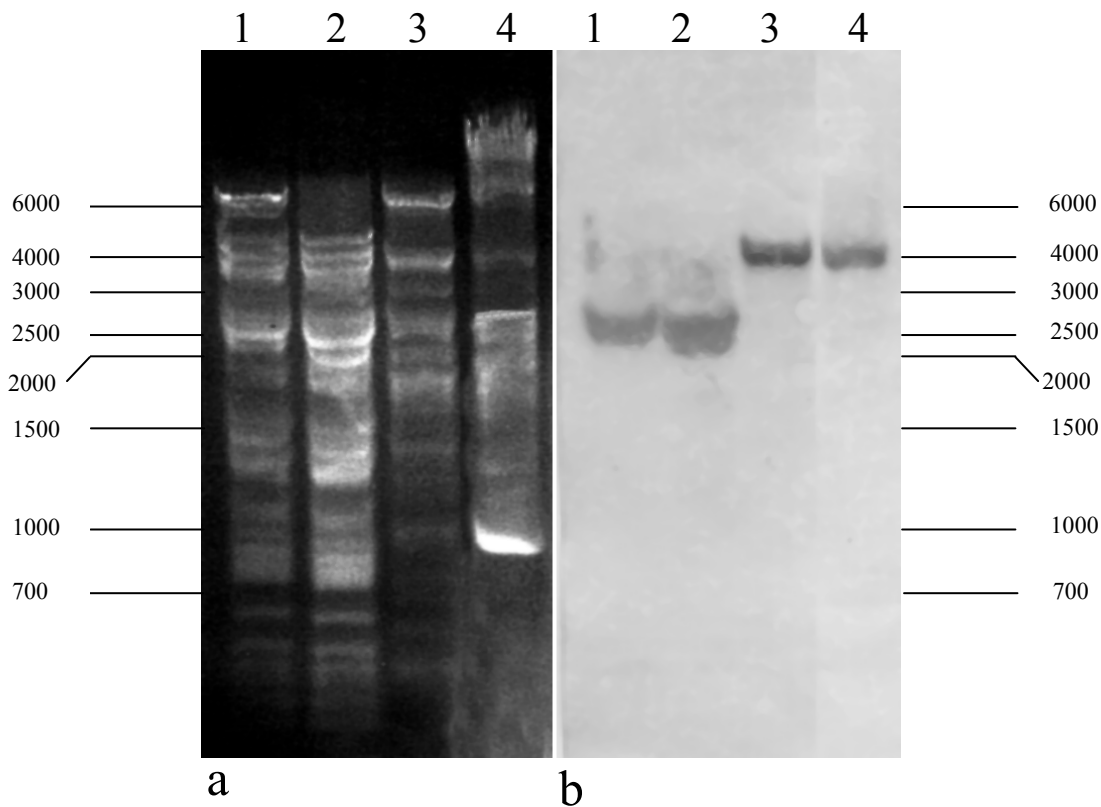


Figure 12. (a) Profils de restriction par *Pst*I des plasmides extraits des souches produisant la BLSE CTX-M-15. (b) Hybridation du *bla*_{CTX-M} par les sondes spécifiques.

1, *E. coli* K1226R793-YC-14; 2, *E. coli* K121R716-YC-17; 3, *E. coli* DH5 α -YC-5 ; 4, *E. coli* YC-2.

III.5. Caractérisation des BLSE

III.5.1. Hydrolyse des β -lactamines par les β -lactamases à spectre élargi

Le test microbiologique d'hydrolyse des β -lactamines par les BLSE nous a permis d'établir l'activité des 19 extraits enzymatiques bruts de BLSE qui ont été obtenus à partir des souches transconjugantes (16), transformantes (2) et clinique (1).

Comparés au témoin n'ayant pas reçu d'extrait enzymatique, les extraits enzymatiques ont hydrolysé complètement (pas de diamètre d'inhibition) les pénicillines (amoxicilline, pipéracilline), la céphalosporine de première génération (céfazoline), les oxyimino- β -lactamines (céfotaxime, ceftriaxone et ceftazidime, céfépime) et le monobactame (Aztreonam). Aucune activité n'a été notée sur l'imipénème, la céfoxitine et l'amoxicilline/acidé clavulanique. Les diamètres moyens des zones d'inhibition mesurés ont été respectivement de 3,5 cm, 3 cm et 2 cm respectivement pour l'imipénème, la céfoxitine et l'amoxicilline/acidé clavulanique. Toutefois, l'activité des différents extraits a été variable sur l'amoxicilline/acidé clavulanique. Cet antibiotique est formé de l'association d'une pénicilline (amoxicilline) et d'un inhibiteur de pénicillinase (acidé clavulanique). L'inactivité des extraits enzymatiques bruts sur cet antibiotique montre qu'ils sont inhibés par l'acidé clavulanique car leur activité a été totale sur l'amoxicilline.

Ces résultats confirment bien que les extraits enzymatiques qui ont été étudiés sont des BLSE et appartient au groupe A de Ambler et au groupe 2be de Bush-Jacoby-Medeiros.

III.5.2. Points isoélectriques

L'analyse des points isoélectriques (pIs) a permis de montrer que les différentes souches ayant présenté une image de synergie entre oxyimino-céphalosporines et amoxicilline/acidé clavulanique produisent en général au moins un autre type de β -lactamase en plus des BLSE. Les pIs de ces β -lactamases sont situés entre 5,4 -9,5 (Tableau 12).

Après transfert du gène de résistance, les souches transconjugantes et transformantes produisent des β -lactamases dont les pIs varient de 5,4 à 8,8. En effet, 12 souches produisent les BLSE de pI 8,2 ; deux souches en plus de cette BLSE produisent deux autres enzymes de pIs 5,4 et 8,5. Les souches de phénotypes CTX-M produisent soit une enzyme (pI 8,4 ; une souche) soit deux (pIs 7,3, 8,8 ; 2 souches) ou alors 3 types (pIs 5,4 ; 7,3 et 8,8 ; une souche) (Tableau 13).

Se basant sur les pIs il est difficile de déterminer avec exactitude le type de BLSE car des enzymes différentes peuvent avoir les mêmes pIs.

III.5.3. Détection du gène codant pour la production des BLSE

Les souches transconjugantes (16), transformantes (2) et clinique (1) ont été soumises à la technique de PCR et PCR/NheI pour la recherche du type de gène BLSE en utilisant les amorces spécifiques pour *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX} et *bla*_{OXA}. L'examen des produits de PCR après électrophorèse sur gel d'agarose a permis de noter que (tableau 13) :

- 14 souches ont produit avec les amorces spécifiques de *bla*_{SHV} des amplicons de 1017 bp. Ces amplicons ont été ensuite clivés par NheI en deux produits de tailles respectives de 770 bp et 247 bp. Cette PCR/NheI positive indique la production des BLSE du type SHV par ces souches (Figure 13 a, b) ;
- 5 souches ont donné des produits PCR avec d'abord les amorces spécifiques de *bla*_{CTX-M} et ensuite de *bla*_{CTX-M-3} (Figure 14) ;
- 4 souches des souches productrices de BLSE CTX-M ont produit des amplicons avec les gènes spécifiques au *bla*_{OXA} ;
- De même 4 souches dont deux productrices de BLSE SHV et deux autres de BLSE CTX-M ont donné des produits PCR avec les amorces spécifiques du gène *bla*_{TEM} .

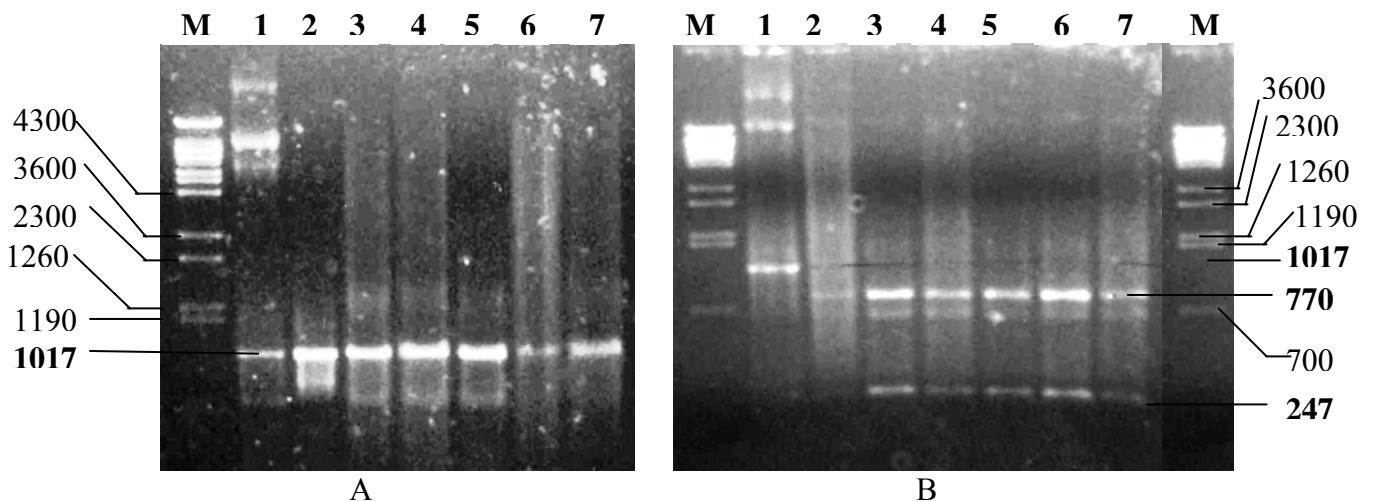


Figure 13 : Gel d'agarose des produits de PCR de SHV avant (A) et après (B) la digestion par *NheI*.

M, marqueur poids moléculaire (bactériophage λ BstEII) ; 1, *E. coli* pMPA (contrôle positif) ; 3-7 (transconjugantes) ; 3, *E. coli* Hk-225-U271 ; 4, *E. coli* Hk-225-09 ; 5, *E. coli* Hk-225-U229 ; 6, *E. coli* Hk-225-U288 ; 7, *E. coli* Hk-225-J55E

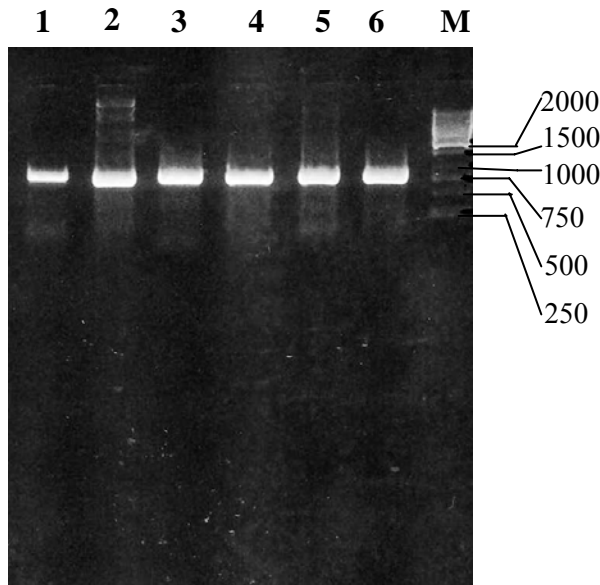


Figure 14 : Gel d'agarose des produits PCR de *bla*_{CTX-M}

M, Marqueurs poids moléculaire (GeneRuler 1kb DNA Ladder) ; **1**, *E. coli* tzang27 (contrôle positif) ; **2**, *E. coli* DH5 α -YC-6 ; **3**, *E. coli* DH5 α -YC-5 ; **4**, *E. coli* K1226R793-YC-14 ; **5**, *E. coli* K1226R793-YC-17 ; **6**, *E. coli* YC-2

III.5.4. Séquençage des gènes *bla*

Les produits PCR après purification ont été directement séquencés (tableau 13). L'examen des différentes séquences a permis de constater que les 14 gènes issus des 14 souches transconjugantes (Tableau 13) positives à la PCR/NehI ont la même séquence nucléotidique. La comparaison entre la séquence nucléotidique du gène SHV de la souche 09 HK 225 *E. coli* et la séquence standard du gène SHV-1 (Bradford, 1999) (Annexe C, figure 28) nous a permis de noter 5 différences dont 3 entraînent des substitutions des acides aminés et deux qui sont des mutations silencieuses n'entraînant pas de changement d'acide aminé.

Par rapport au gène SHV-1, les différentes mutations après la numérotation des acides aminés suivant Ambler *et al.* (1981) ont été observées aux positions :

- 35 [Leucine (SHV-1) \longrightarrow Glutamine (09 HK 225 *E. coli*)];
- 238 (Glycine \longrightarrow Sérine) ;
- 240 (acide glutamique \longrightarrow Lysine),
- 138 (Leucine) ;
- 268 (thréonine).

Ces différentes mutations ont permis de dire que le gène séquencé est le gène *bla_{SHV-12}* responsable de la production de la BLSE du type SHV-12 (Nüesch-Inderbinnen *et al.*, 1997) correspondant au pI 8,2. Les gènes *bla_{SHV}* des 14 souches transconjugantes ont montré la même séquence nucléotidique et produisent ainsi toutes la BLSE SHV-12.

La comparaison entre la séquence nucléotidique du gène SHV-12 standard telle que décrite par Nüesch-Inderbinnen *et al.* (1997) (N° d'accèsion au EMBL X98105) avec celle de la souche 09 HK 225 *E. coli* montre que les deux gènes sont identiques en tous les points (Annexe D, figure 29). La séquence du gène *bla_{SHV-12}* avec les régions l'entourant a été déposée à GenBank avec comme numéro d'accèsion AY940490.

L'analyse des séquences nucléotidiques des cinq souches productrices de CTX-M a permis de montrer que les souches *E. coli* YC-2, YC-5, YC-14 et *K. pneumoniae* YC-17 produisent toutes une même BLSE, le type CTX-M-15 alors que la souche *K. pneumoniae* YC-6 produit la BLSE CTX-M-1. La CTX-M-15 diffère de la CTX-M-3 par une seule substitution à la position 240 (numérotation de Ambler, 1981) où l'aspartate remplace la glycine.

Le séquençage des amplicons de TEM et OXA ont permis de montrer que les β-lactamases de pIs 7,3 et 5,4 correspondent respectivement à OXA-30 et TEM-1.

III.5.5. Environnement génétique du gène *bla_{CTX-M-15}*

L'environnement génétique du gène *bla_{CTX-M-15}* a été étudié dans les plasmides pYC-5b et pYC-14.

Dans le plasmide pYC-5b, la séquence d'insertion *ISEcp1* constitué du gène entier *tnpA* et 2 séquences de répétition (IRL et IRR) imparfaites de 30 bp caractéristique de cet élément (N° d'accèsion AJ242809) (Mahillon & Chandler, 1998) a été localisé à 48 bp en amont du gène *bla_{CTX-M-15}*. Le promoteur du gène *bla_{CTX-M-15}* a été identifié à l'intérieur de la séquence non codante de l'extrémité 3' de *ISEcp1* (Poirel *et al.*, 2003). Une séquence de 18 bp correspondant à la partie externe de IRR de *ISEcp1* (IRR putatif) a été trouvée à 373 bp en aval de *bla_{CTX-M-15}*. Cette séquence de 373 bp possède 55% d'homologie avec la région correspondante du chromosome de *Kluyvera cryocrescens* (entre 3304 et 3677 dans la séquence avec le N° d'accèsion AY02641) (Decousser *et al.*, 2001).

La séquence *ISEcp1-bla_{CTX-M-15}* est flanquée de part et d'autre par une séquence répétitive de 5 bp, insérée dans le *tnpA* (*tnpA*Δ1, position 214 à partir de l'extrémité 5', *tnpA*

$\Delta 2$, position 2246) de la séquence Tn2. Ce dernier possède aussi une partie du *tnpR* (*tnpRA ; position 173 à partir de l'extrémité 5') et flanqué par la séquence de répétition de l'élément IS26 (Figure 15a). Les formes tronquées de la transposase et de la resolvase de Tn2 sont très probablement non fonctionnelles.*

Un segment homologue, s'étendant de l'extrémité 3' du gène *tnpA* de *ISEcp1* jusqu'à l'extrémité droite de IS26 est porté par le plasmide pYC-14. Cette séquence est suivie par IS26 (Figure 15b).

Les différentes séquences de pYC-5b et pYC-14 ont été déposées dans GenBank avec les numéros d'accès respectifs AY604721 et AY604722.

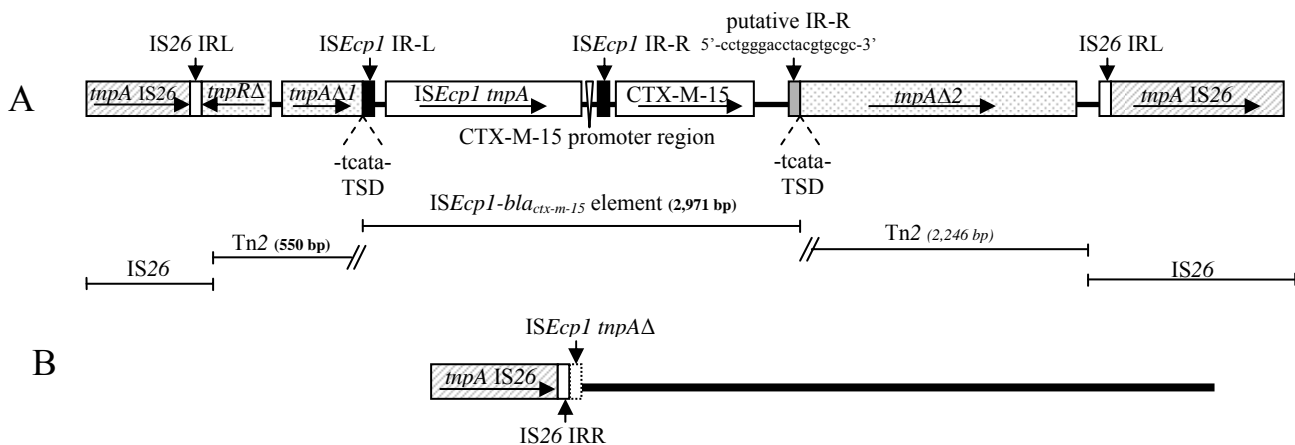


Figure 15 : Représentation schématique des séquences *ISEcp1-bla_{CTX-M-15}* dans les plasmides pYC-5b (A) et pYC-14 (B). Séquence répétitive Inversée (IR), site cible de réplication (TSD). Les flèches indiquent la direction de la transcription. La barre épaisse indique l'homologie avec la séquence de A.

III.6. Épidémiologie moléculaire des souches productrices de CTX-M-15.

Le typage par ERIC-PCR des 5 souches cliniques productrices de la BLSE CTX-M a révélé 4 profils différents (Figure 16). Les souches *E. coli* YC-2 et YC-5 ont le même profil ERIC-PCR indiquant qu'il s'agit de la même souche qui est différente de la souche *E. coli* YC-14. Les deux *K. pneumoniae* sont différentes. La diffusion du gène de résistance de *bla_{CTX-M-15}* s'effectuerait premièrement par les plasmides mais aussi par un transfert horizontal, une souche pouvant passer d'un patient à un autre.

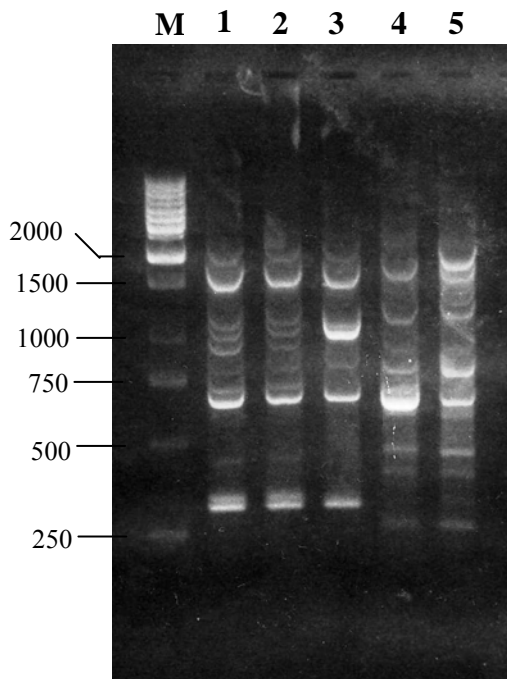


Figure 16 : Gel d'agarose des produits de ERIC-PCR des souches cliniques productrices de la BLSE CTX-M. M, marqueur 1kb DNA ladder ; 1, *E. coli* YC-2 ; 2, *E. coli* YC-5 ; 3, *E. coli* YC-14 ; 4, *K. pneumoniae* YC-6 ; 5, *K. pneumoniae* YC-17.

III.7. Activité des extraits et produits purs des plantes sur les β -lactamases

III.7.1. Activité inhibitrice des extraits bruts

Le screening de l'activité inhibitrice de plantes médicinales à la concentration de 6 mg/ml sur les β -lactamases a montré que la vitesse résiduelle de ces enzymes varie suivant le type d'extrait de plante de 0,1 à 18% pour *Garcinia lucida* et de 0,2 à 37% pour *Bridelia micrantha*. Partant du fait selon lequel plus l'activité résiduelle est faible plus l'extrait de plante a une forte activité inhibitrice, l'extrait de *G. lucida* a été très active sur les β -lactamases P99 (0,1%), OXa-10 (0,2%) et IMP-1 (1,7%). Par contre, L'extrait de *B. micrantha* a eu une forte activité inhibitrice sur la β -lactamases OXA-10 (0,8%) (Figure 17).

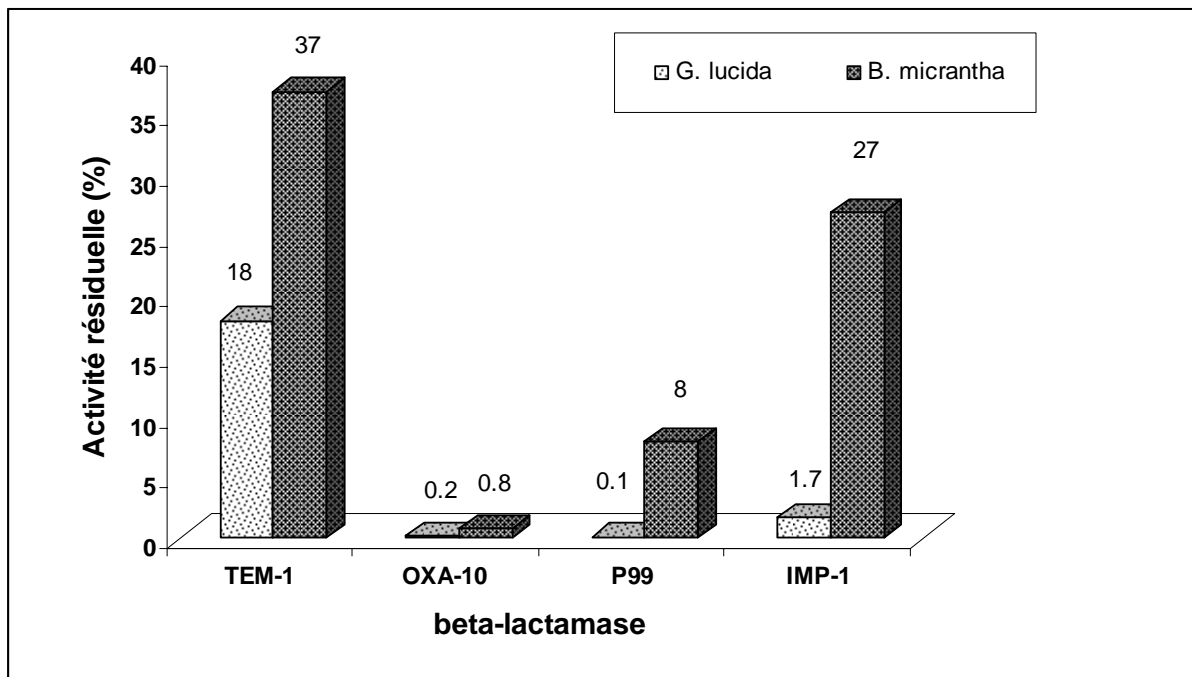


Figure 17 : Activité résiduelle (%) des β -lactamases vis-à-vis des plantes médicinales

Pour mieux évaluer l'activité inhibitrice de ces extraits sur les β -lactamases, plusieurs concentrations ont été testées après avoir éliminé les tanins desdits extraits.

L'extrait de *G. lucida* a montré une très bonne activité inhibitrice sur la β -lactamase P99 (Figures 18 et 19). A la concentration de 0,012 mg/ml, l'activité résiduelle de P99 est de 42,7%. La concentration inhibant 50 % (CI₅₀) de l'activité de P99 est de 0,01 mg/ml. La courbe $V_i/V_o = f(I)$ (figure 19) se rapproche d'une hyperbole indiquant que l'inhibition de P99 par l'extrait de *G. lucida* serait due à un seul produit.

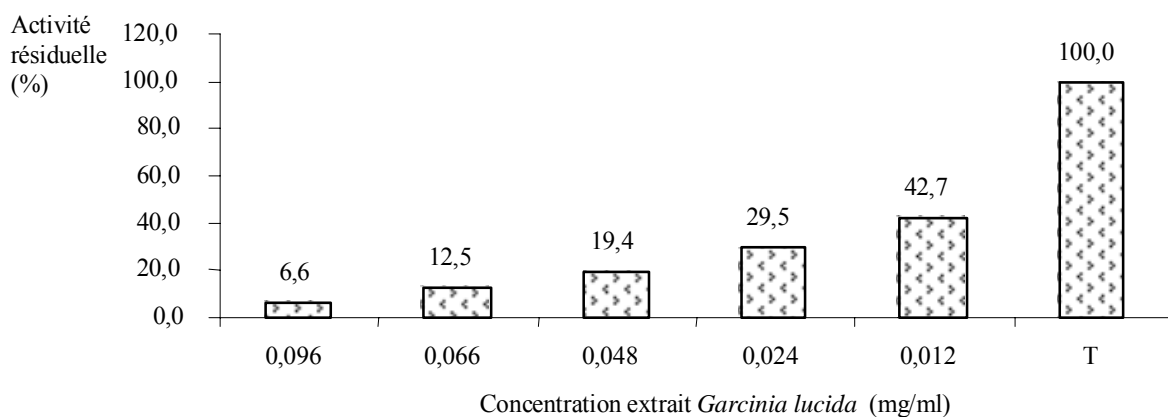


Figure 18 : Activité résiduelle de P99 vs *G. lucida*

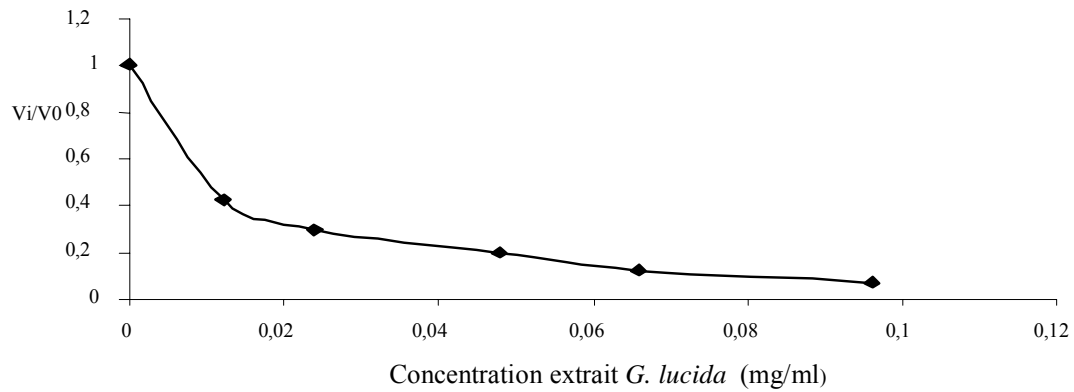


Figure 19 : Variation de Vi/Vo de P99 en fonction de la concentration de l'extrait *G. lucida*

L'extrait de *B. micrantha* a montré une bonne activité inhibitrice sur la β -lactamase OXA-10 comme l'indiquent les figures 20 et 21. L'activité résiduelle de cette enzyme reste faible (25%) à une concentration de 0,3 mg/ml de l'extrait ($CI_{50} = 0,019$ mg/ml). Comme pour la β -lactamase P99 vis-à-vis de l'extrait de *G. lucida*, la courbe $Vi/Vo = f(I)$ montre une bonne activité inhibitrice de l'extrait de *B. micrantha*. L'allure de la courbe se rapproche d'une hyperbole, indiquant ainsi que l'inhibition de l'enzyme serait due à un seul produit.

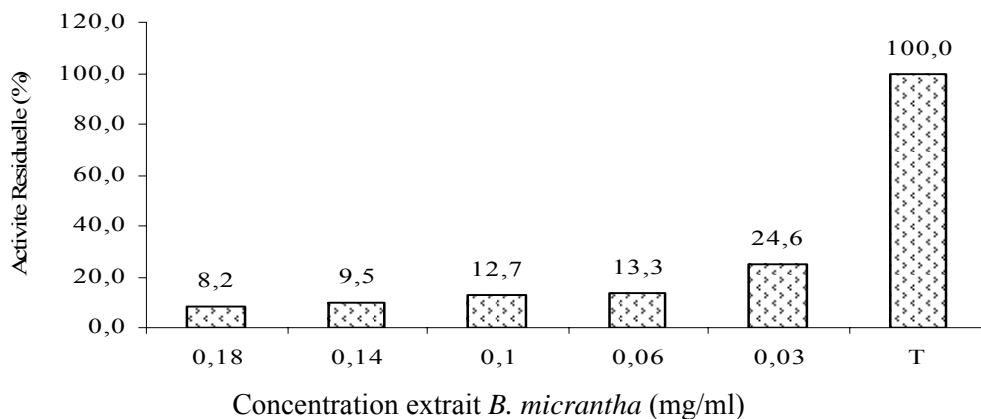


Figure 20 : Activité résiduelle de OXA-10 vs extrait de *B. micrantha*

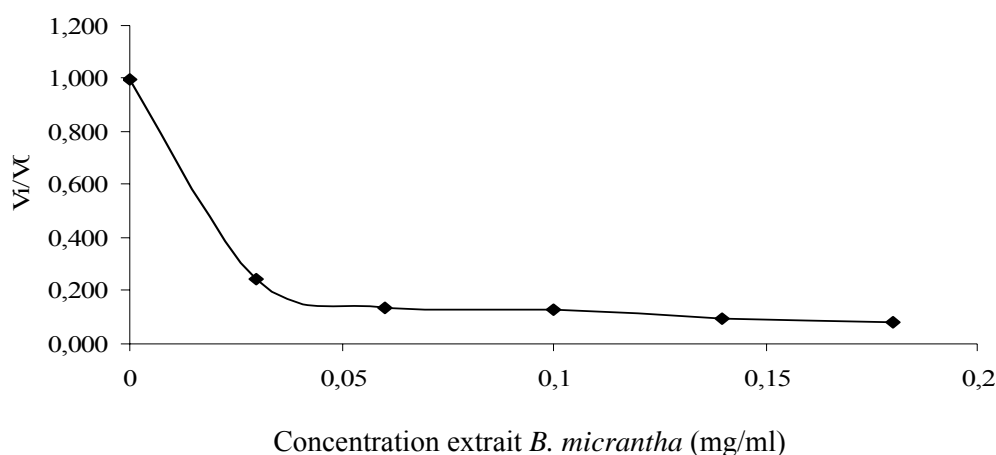


Figure 21 : Variation de V_i/V_o de OXA-10 en fonction de la concentration de l'extrait de *B. micrantha*.

L'activité inhibitrice de ces deux composés a été testée sur les autres β -lactamases. A la concentration de 0,4 mg/ml de l'extrait de *G. lucida*, les activités résiduelles de IMP-1 et de OXA-10 ont été respectivement de 61% et 43 %. Quant au TEM-1, son activité résiduelle a été de 39% à 4 mg/ml de cet extrait.

Les activités résiduelles de TEM-1 et P99 à 4 mg/ml de l'extrait de *B. micrantha* ont été de 47% et 44% respectivement.

Prenant en compte ces résultats, les extraits de *G. lucida* et *B. micrantha* ont été fractionnés et purifiés par chromatographie liquide haute performance.

III.7.2. Activité inhibitrice des produits purs des extraits de *G. lucida* et *B. micrantha*

III.7.2.1. *Garcinia lucida*

Les figures 22A et 22B montrent les chromatogrammes de l'extrait brut et de l'extrait dans lequel les tanins ont été éliminés. Nous avons constaté que le traitement de l'extrait par la poudre de peau enlève bel et bien un certain nombre de produits. A part les produits qui sont sortis à partir de 20 mn dans le fractionnement de l'extrait brut, tous les autres pics ont été observés autant dans l'extrait brut que dans celui dont les tanins ont été enlevés. Nous avons collecté 7 pics entre 0 et 17 mn (figure 22A). Les différents pics collectés ont montré une activité inhibitrice sur P99.

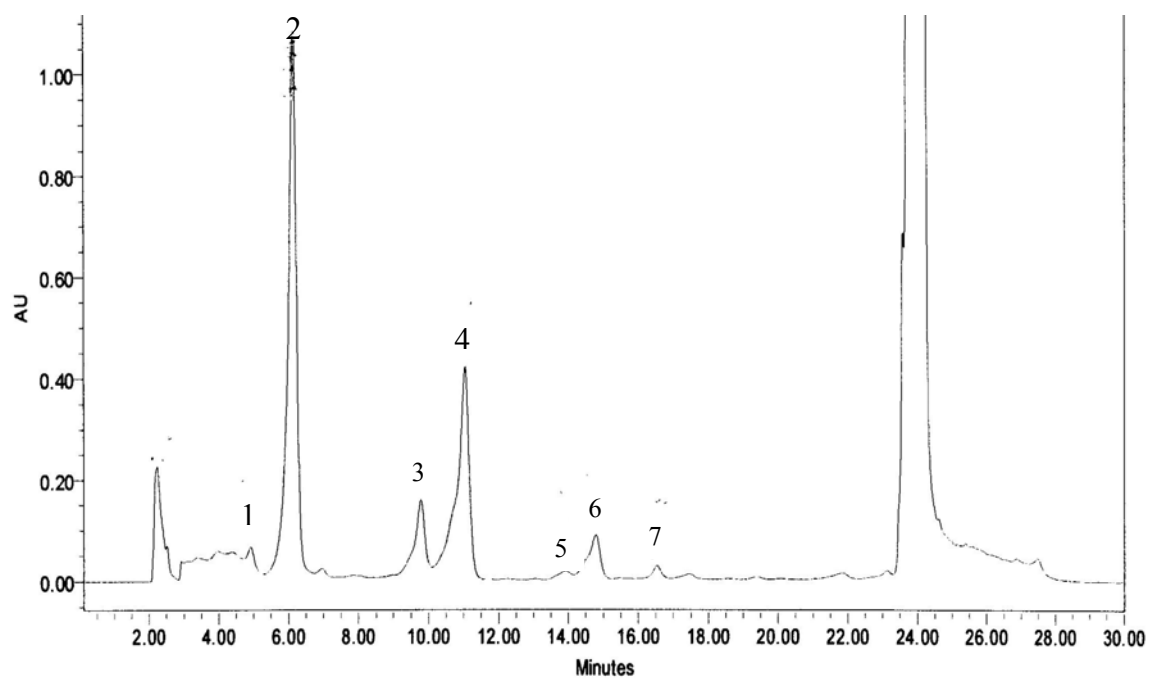


Figure 22A : Chromatogramme extrait brut de *G. lucida*

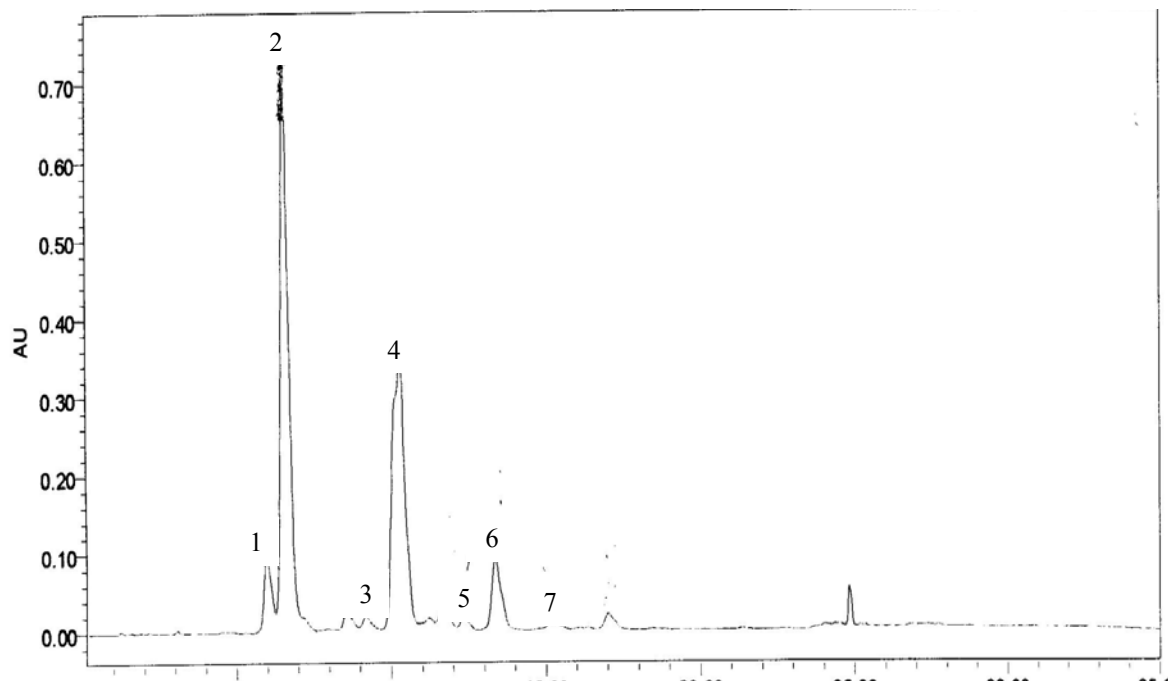


Figure 22B : Chromatogramme extrait de *G. lucida* dépourvu de tanin

Ces différents pics ont été purifiés. Les activités des produits purs provenant des pics 2 et 4 ont été étudiées vis-à-vis de P99. La figure 23 montre que l'activité résiduelle de P99 est de 50% (CI_{50}) à la concentration de 0,03mg/ml du produit 4. L'hyperbole obtenue à la figure 24 confirme cette bonne inhibition de l'enzyme P99 par le produit 4. Par contre le produit 2 est moins actif (Figure 25) avec de forte activité résiduelle (42 %) observée à la concentration de 10mg/ml. L'activité inhibitrice du produit 4 augmente avec le temps de préincubation de l'enzyme alors que celle du produit 2 baisse plutôt.

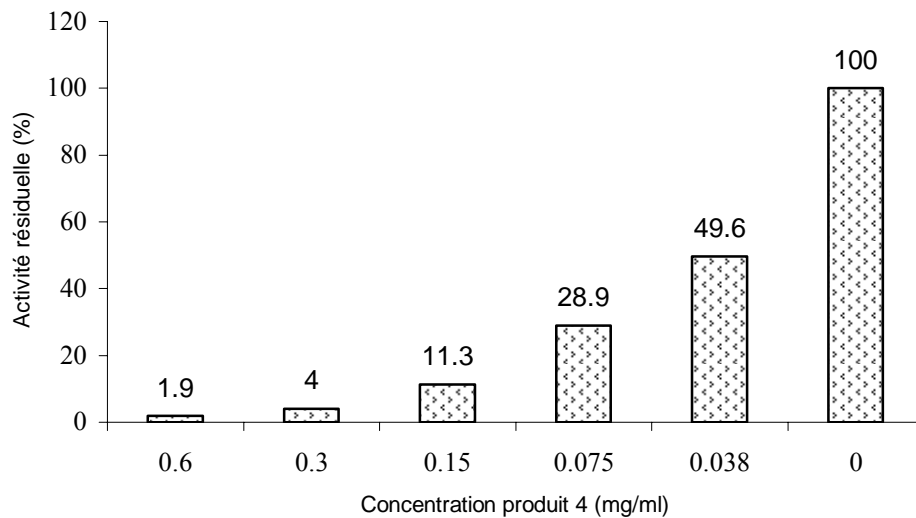


Figure 23 : Activité résiduelle de P99 vs produit 4 de *G. lucida*

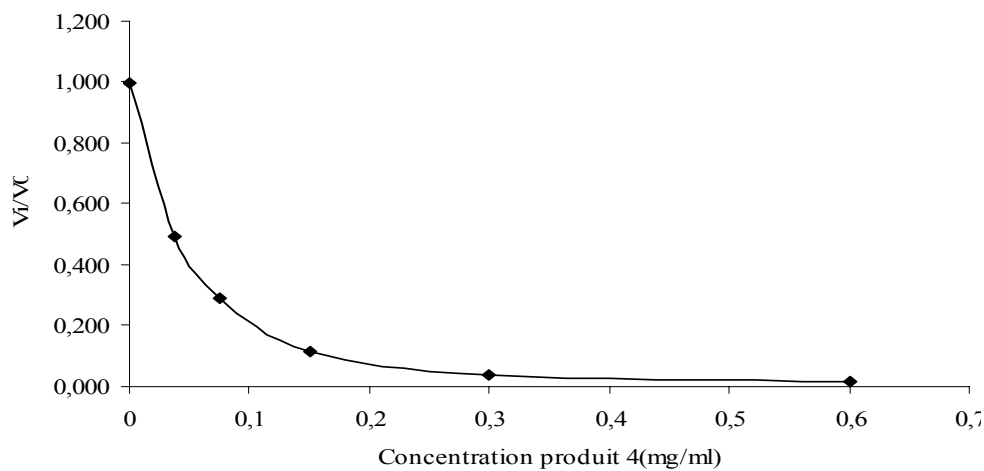


Figure 24 : Variation de V_i/V_o de P99 en fonction de la concentration du produit 4 (*G. lucida*)

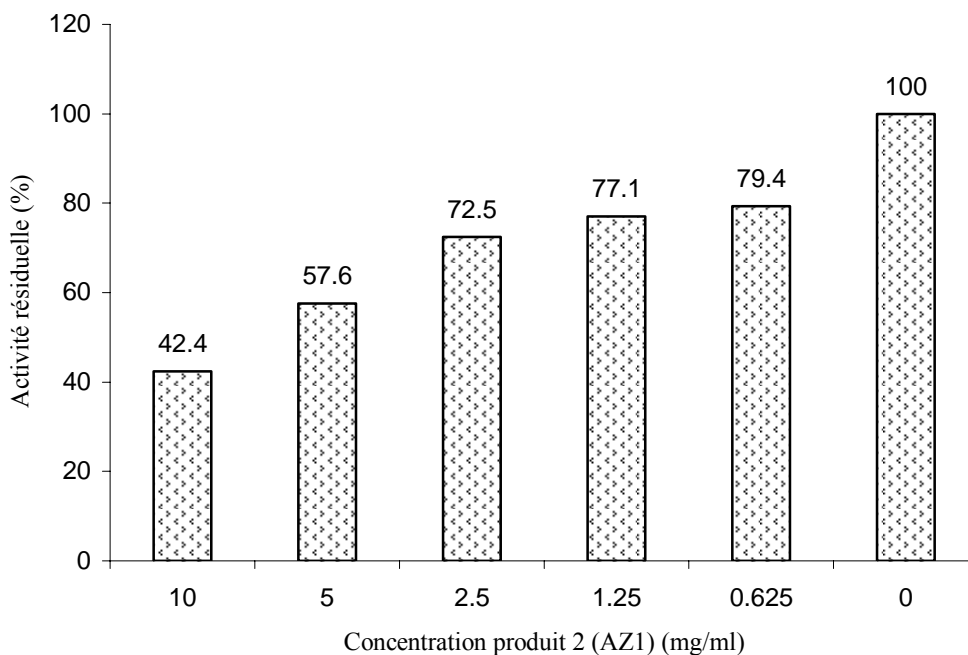


Figure 25 : Activité résiduelle de P99 vs produit 2 (*G. lucida*)

III.7.2.2. *Bridelia micrantha*

Les chromatogrammes des extraits bruts et traités à la poudre de peau de *B. micrantha* ne sont pas très différents (figures 26A et 26B). L'unique différence se situe au pic 2' présent dans l'extrait brut et non dans celui dans lequel les tanins ont été éliminés. La poudre de peau n'enlève pas grand-chose dans l'extrait brut. Nous avons collecté 8 fractions (figure 26A). Après avoir déterminé l'activité des différentes fractions sur l'enzyme OXA-10, les pics 2', 3', 6' et 7' ont été purifiés.

Le tableau 14 donne l'activité résiduelle de OXA-10 vis-à-vis des différents produits purs. Les produits 2' et 3' sont ceux qui présentent une forte activité inhibitrice vis-à-vis de la β -lactamase OXA-10.

La courbe de $f(I)=V_i/V_0$ montre qu'on a globalement deux profils d'inhibition. Le premier est constitué des produits 2' et 3' qui présentent une bonne activité inhibitrice sur OXA-10 (CI_{50} de 0,09 mg/ml et 0,11 mg/ml respectivement) et le second est formé des produits 6' et 7' qui ont une activité inhibitrice plus faible que les précédents produits (CI_{50} de 0,41 mg/ml et 0,38 mg/ml respectivement) (figure 27). Quel que soit le produit, l'activité inhibitrice augmente avec le temps de préincubation de l'enzyme.

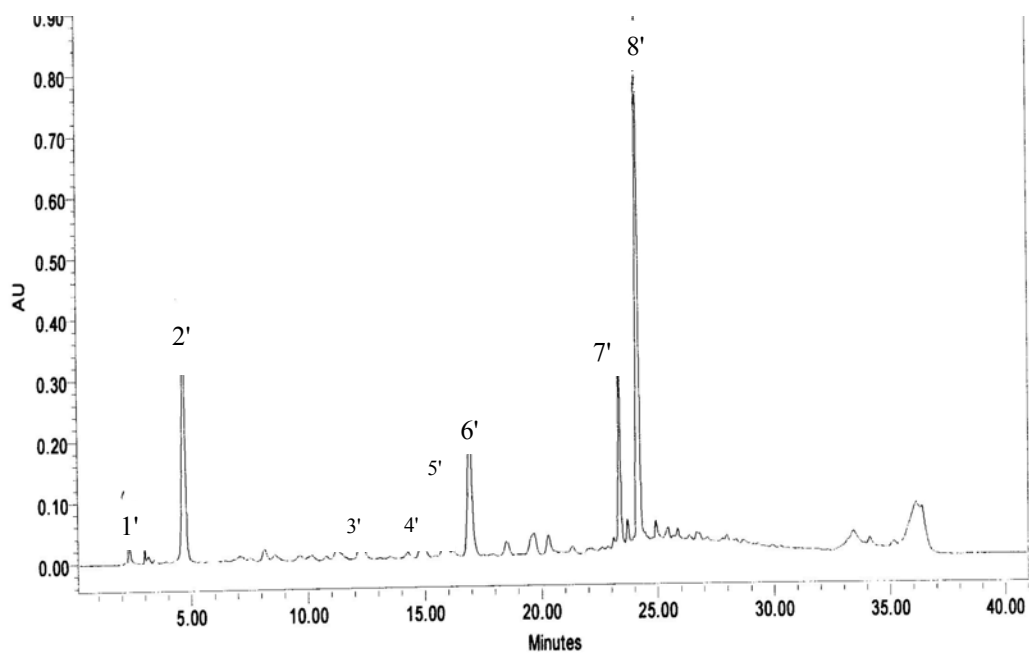
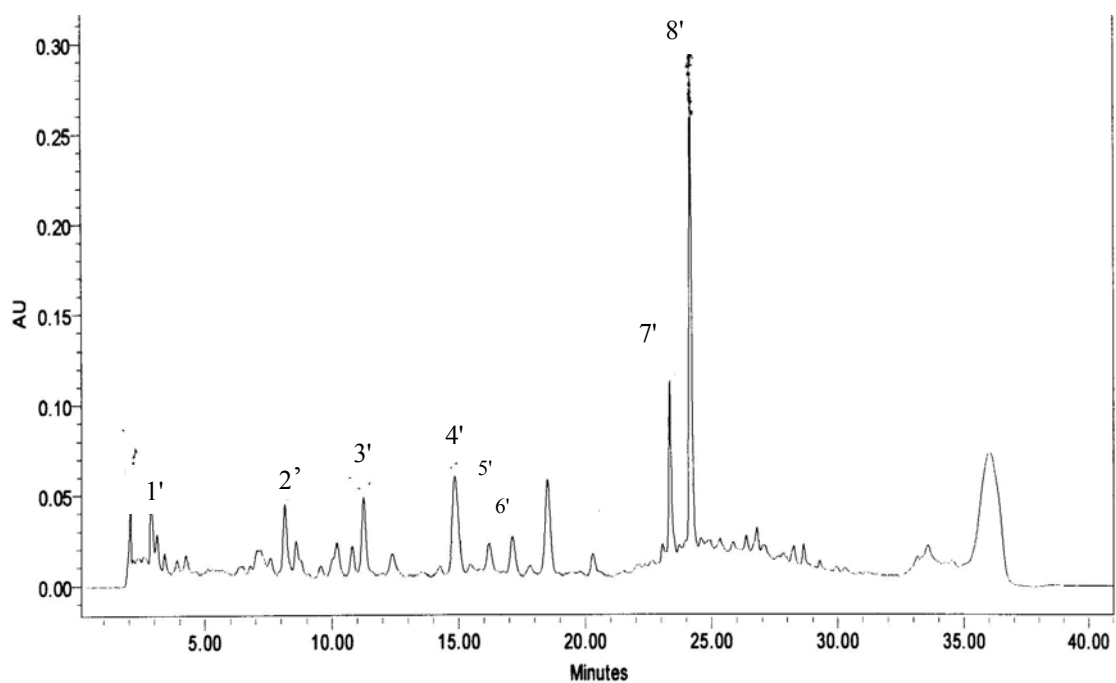
Figure 26A : Chromatogramme extrait brut de *B. micrantha*Figure 26B : Chromatogramme extrait de *B. micrantha* dépourvu de tanin

Tableau 14 : Activité résiduelle de OXA-10 vs produits purs de *B. micrantha*

Produit pur	Activité Résiduelle (%)					
	0,6 mg/ml	0,3 mg/ml	0,15 mg/ml	0,075 mg/ml	0,038 mg/ml	0 mg/ml
pr2'	3	8	30	73	91	100
pr3'	2	3	13,1	66,1	93	100
pr6'	23	65	74	80	84	100
pr7'	17	62	77	84	90	100

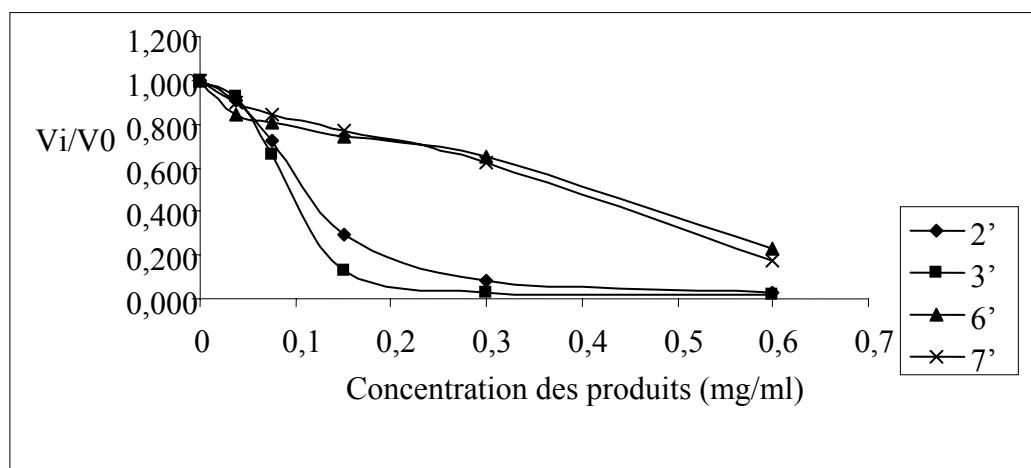


Figure 27 : Variation de V_i/V_0 en fonction de la concentration des produits purs de *B. micrantha*

CHAPITRE IV
DISCUSSION

CHAPITRE IV DISCUSSION

L'objectif de cette étude a été de caractériser les BLSE produites par les souches d'Entérobactéries isolées des patients hospitalisés à l'Hôpital Central de Yaoundé (HCY) et de rechercher l'inhibition de ces β -lactamases par les extraits de plantes médicinales (*Garcinia lucida* et *Bridelia micrantha*). Nous avons observé le phénotype BLSE chez tous genres étudiés et 31 des 38 souches présentant ce phénotype ont été isolées entre 1995-1998, représentant ainsi une prévalence de 12% des 259 souches d'Entérobactéries isolées à la dite période. La prévalence de BLSE a été de 18,8% chez *Klebsiella* et a varié de 1,8 à 17,7% pour les autres genres. Des 38 souches productrices de BLSE étudiées, 16 (42,1%), ont transféré leur gène de résistance par conjugaison. La caractérisation de ces souches transconjugantes, deux souches transformantes et une souche clinique a permis de mettre en évidence la production des BLSE des types SHV (SHV-12) et CTX-M (CTX-M-1 et CTX-M-15) par les espèces d'Entérobactéries de l'HCY. La recherche de l'inhibition des β -lactamases par les extraits et les produits purs des plantes médicinales a permis de montrer que : les extrait de *G. lucida* ont une bonne activité inhibitrice (CI₅₀ extrait brut, 0,01 mg/ml ; CI₅₀ produit pur, 0,03mg/ml) sur la β -lactamase de la classe C (P99). De même, l'extrait de *B. micrantha* inhibe bien l'activité de la β -lactamase de la classe D (OXA-10) (CI₅₀ extrait brut, 0,019 mg/ml ; produits purs, 0,09 mg/ml, 0,11 mg/ml). A notre connaissance, cette étude constitue la première qui caractérise les BLSE et recherche les inhibiteurs de BLSE au Cameroun.

Les résultats de la sensibilité aux antibiotiques ont montré en général que les Entérobactéries présentent un taux de résistance aux antibiotiques communément utilisés. Toutes les bactéries étudiées ont montré un haut niveau de résistance vis-à-vis des pénicillines, les céphalosporines de première génération et le triméthoprim/sulfaméthoxazole. Plusieurs souches multirésistantes ont été observées. Cette multirésistance peut s'expliquer par le fait que les gènes responsables de ces résistances peuvent être portés par le même plasmide, par la coexistence de plusieurs mécanismes de résistance, ou par la production de plusieurs types enzymatiques (Sanders, 1992 ; Sirot, 1995 ; Jacoby, 1997 ; Pitout, 1998).

Les taux de résistance que nous avons observés sont très élevés pour la plupart des antibiotiques par rapport à ceux observés dans les pays développés mais se rapprochent des taux de résistance rapportés dans les pays en développement (Gangoué Piéboji, 2000 ; Lamikanra & Ndep, 1989 ; Philippon *et al.*, 1994, Livermore, 1995 ; Huovinen, 1997 ; Pfaller *et al.* , 1998, Koulla-Shiro *et al.*, 1998). Ce niveau de résistance élevé est une

conséquence de l'acquisition des facteurs de résistance aux antibiotiques qui est généralement secondaire à l'utilisation abusive et incontrôlée de ces antibiotiques (OKEKE *et al.*, 1999 ; Lesch *et al.*, 2001 ; Kolar *et al.*, 2001 ; Monnet *et al.*, 1998). En Afrique, des bactéries résistantes au triméthoprim/sulfaméthoxazole ont été mises en évidence dans les selles des enfants qui n'ont jamais été exposés aux antibiotiques (Huovinen *et al.*, 1995), ce qui témoigne de l'émergence et de la dissémination des germes résistants aux antibiotiques à cause généralement des mauvaises conditions de vie et d'hygiène observées dans les pays en développement. Ces résultats sur la sensibilité aux antibiotiques confirment les résultats des travaux déjà rapportés sur la prévalence élevée de la résistance des entérobactéries aux β -lactamines et au triméthoprim/sulfaméthoxazole dans les pays en développement, qui est plus élevée que celles des pays développés.

Dans cette étude, la majorité des souches productrices des BLSE ont été isolées des patients hospitalisés dans les services de chirurgie et de soins intensifs. Dans ces services, les bactéries sont soumises à une pression élevée des antibiotiques. Bien plus, plusieurs de ces patients sont particulièrement vulnérables aux infections à cause de leur immunodéficience ou ont des portes d'accès facile aux bactéries dues au traitement traumatisant (Xiong *et al.*, 2002)

Les données de la sensibilité des souches productrices de BLSE ont montré que ces souches sont non seulement résistantes à la plupart des β -lactamines, mais aussi aux antibiotiques non- β -lactamines comme la gentamicine et le triméthoprim-sulfaméthoxazole. Les BLSE sont généralement portées par de grands plasmides qui en plus portent aussi les gènes de résistances aux autres antibiotiques non- β -lactamines tels les aminoglycosides, le triméthoprim-sulfaméthoxazole, les quinolones et le métronidazole. Il a été montré que l'utilisation de ces antibiotiques contribue à la sélection des souches productrices de BLSE (Paterson & Bonomo, 2005 ; Jacoby, 1997 ; Xiong *et al.*, 2002). Les résultats de cette sensibilité aux antibiotiques ont aussi montré que toutes les souches sont sensibles à l'imipénème, et que la plupart sont sensibles à l'amikacine, au céfoxitine et au ciprofloxacine. La résistance de ces souches à la céfoxitine pourrait s'expliquer par l'hyperproduction des céphalosporinases par ces souches (Bradford, 2001) ou par altération des porines de la membrane externe (Coudron *et al.*, 2000 ; Martinez-Martinez *et al.*, 1996 ; Medeiros *et al.*, 1987). Les carbapénèmes sont les antibiotiques de premier choix chez un patient infecté par une souche productrice de BLSE car ils ne sont pas hydrolysés par ces enzymes. Toutefois, les quinolones peuvent aussi être utilisées seules ou en combinaison avec le métronidazole suivant le site de l'infection (Paterson & Bonomo, 2005).

Les résultats de ces travaux met en évidence une éruption des souches BLSE à l'HCY au cours de la période de l'étude, entre 1996-1998 et 2002. Cette éruption est attribuée à au moins quatre espèces d'Entérobactéries : *K. pneumoniae*, *E. coli*, *C. freundii* et *E. cloacae*. Bien que le gène *bla_{SHV-12}* soit co-transféré avec les déterminants des autres résistances par conjugaison et a été trouvé chez plusieurs espèces, il serait possible que ce gène soit porté par un grand plasmide en faible nombre comme c'est souvent le cas (Jacoby, 1997 ; 1994). Dans cette étude, en ce qui concerne les souches productrices de BLSE de type SHV, nous avons choisi travailler sur les souches qui peuvent facilement transférer leur gène de production de BLSE par conjugaison in vitro (plus du tiers des souches productrices des BLSE à l'HCY) parce que c'est le facteur le plus important au niveau clinique dans la dissémination rapide des déterminants de la résistance. L'extraction des plasmides portant le gène CTX-M-15 nous a permis de montrer que ce gène est porté par un grand plasmide, de taille approximative variant entre 50 et 90 Kb. Ce plasmide porte en plus d'autres gènes de résistances aux antibiotiques et de production d'autres types de β -lactamases (TEM-1, OXA-30). La présence de tous ces gènes explique bien la multirésistance des souches qui les portent.

Des 69 souches ayant présenté une résistance à au moins une oxyimino-céphalosporine, le test de double synergie n'a été positif que pour 38 (55%) souches. De plus nous avons noté une très grande variation des CMI des différentes souches vis-à-vis des céphalosporines de 3^{ème} génération, qui à tort peuvent être considérées comme sensibles. La synergie a été notée chez 86%, 90%, 62% et 97% des souches autour des disques de céfotaxime, ceftriaxone, ceftazidime et aztreonam respectivement. Ces résultats montrent que pour avoir une bonne sensibilité lorsqu'on recherche les BLSE, plusieurs oxyimino-céphalosporines et l'aztréoname doivent être utilisés dans le test de double synergie. Ceci est en accord avec les recommandation de Coudron *et al.*, (1997). Toutefois cette conclusion montre le fait que le test de double synergie et autres tests physiologiques ont une sensibilité limitée dans la détection des souches productrices de BLSE, fait qui avait déjà été signalé en 1995 par Livermore (1995) et confirmé par des travaux de mutagenèse dirigée (Stapleton *et al.*, 1999 ; Randegger *et al.*, 2000).

La vessie est un site de l'organisme humain où on observe des concentrations élevées en certains antibiotiques (quinolones et β -lactamines) (NCCLS, 1999). La majorité des souches productrices de BLSE a été mise en évidence dans les urines. Ce résultat corrobore ceux de Philippon *et al.* (1993) et de Bermudes *et al.* (1997) qui rapportent que la majorité des souches BLSE proviennent de l'urine.

Les BLSE constituent aujourd'hui un problème mondial chez les patients hospitalisés. La prévalence des Entérobactéries productrices de BLSE varie d'un pays à un autre, d'une institution à l'autre (Bradford, 2001 ; Winokur *et al.*, 2001 ; Paterson & Bonomo, 2005). La prévalence de 12% que nous avons observé dans cette étude est supérieure à celle observée en Hollande (2%), Allemagne (2,6%), France (5,2%) et inférieure à celle rapportée en Egypte (38,5%), Grèce (27,4%), Afrique du Sud (15%) (Bouchillon *et al.*, 2004). En Hollande, la prévalence des souches de *E. coli* et *K. pneumoniae* productrice de BLSE est <1% ; Cependant, plus de 40% de souches de *K. pneumoniae* sont résistantes à la ceftazidime en France. Au Japon, le pourcentage de production de BLSE chez *E. coli* et *K. pneumoniae* est <0,1 et 0,3% respectivement, comparé à 4,8% (Corée), 8,5% (Taiwan) et plus de 12% à Hong Kong (Bradford, 2001). Les prévalences de production de BLSE chez *Klebsiella* et *E. coli* que nous avons observé dans cette étude ont été de 18,8% et 14,3% respectivement. Ces prévalences sont inférieures pour les espèces de *Klebsiella* et supérieures pour *E. coli* à celles rapportées par le programme de surveillance mondiale de la résistance aux antibiotiques (SENTRY) qui sont respectivement de 45% et 8,5 % (Amérique latine), 25% et 7,9% (Pacifique occidental), 23% et 5,3% (Europe) (Winokur *et al.*, 2001). La prévalence de BLSE chez nos souches de *Klebsiella spp.* est inférieure à celle rapportée aux Etats Unis (23,8%) par Jones *et al.* (1998), au Venezuela (32,9%) par Pfaller *et al.* (1998), en Grèce (24%) par Sanders & Sanders (1992), en Tunisie (22%) par Ben Hassen *et al.* (1990) au Sénégal (22%) et en Côte d'Ivoire (21%) par BEN REDJEB *et al.* (1998), en Ethiopie (33,3%) (Seid et Astrat, 2005) en Tanzanie (25%) par Blonblerg *et al.*,(2005). Toutefois, cette prévalence est inférieure à celle (5,2%) rapportée dans plusieurs pays de l'Europe du Nord (France, Allemagne, Hollande, Belgique, Suisse, Autriche) (Bouchillon *et al.*, 2004) et se rapproche de celle observée en Tunisie (17,3%) en 1997 par BEN REDJEB *et al.* (1998).

Le taux de *Citrobacter spp.* (17,6%) productrice de BLSE que nous avons observé est supérieur à celui de 7% et inférieur au taux de 19% rapporté par d'autres études (Coudron *et al.*, 1997 ; Pepperell *et al.*, 2002).

La faible prévalence observée chez *Enterobacter* s'expliquerait par la difficulté de mettre en évidence les BLSE chez ces Entérobactéries à cause de la production de la céphalosporinase (Paterson & Bonomo, 2005).

Le séquençage des produits PCR de 19 souches a permis de mettre en évidence la production de deux types de BLSE par les Entérobactéries isolées à l'HCY. Il s'agit de SHV-12 produite par 14 souches (73,7%) et CTX-M par 5 souches (26,3%) dont CTX-M-1 (une

souche) et CTX-M-15 (4 souches). La BLSE SHV-12 a été isolée pour la première fois en 1997 en Suisse chez une souche de *K. pneumoniae* isolée d'un patient venant de l'Afrique du Nord (Nüesch-Inderbilen *et al.*, 1997). Depuis lors, cette BLSE a une répartition mondiale : Australie (Howard *et al.*, 2002), Canada (Mulvey *et al.*, 2004) ; Chine (Chanawong *et al.*, 2002), Croatie (Bedenic *et al.*, 2001), France (Weill *et al.*, 2004), Grèce (Neonakis *et al.*, 2003), Inde (Dhawan *et al.*, 2003), Italie (Perilli *et al.*, 2002), Japon (Yagi *et al.*, 2000), Corée (Kim *et al.*, 1998), Espagne (Briñas *et al.*, 2003), Taiwan (Yan *et al.*, 2003), Thaïlande (Chanawong *et al.*, 2001), Etats-Unis (Wong-Beringer *et al.*, 2002), Afrique du Sud (Kruger *et al.*, 2004), Tanzanie (Blomberg *et al.*, 2005), Cameroun (Gangoué Piéboji, 2000), RCA (Frank *et al.*, 2006), Tunisie (Ben-Hamouda *et al.*, 2004), Sénégal (Cardinale *et al.*, 2000) et Mali (Weill *et al.*, 2004). La BLSE SHV-12 apparaît alors être un gène particulièrement migratoire. Le fait qu'on ait obtenu 100% d'homologie entre la SHV-12 du Cameroun et la SHV-12 originale (Suisse) montrerait une origine africaine de cette BLSE. Les BLSE de type TEM et particulièrement du type SHV sont très rarement trouvées chez certains genres d'Entérobactéries tels *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*, chez lesquels la céphalosporinase chromosomique est prédominante (Jacoby, 1994 ; Livermore, 1995). Néanmoins, la BLSE SHV-4 a été mise en évidence chez *Serratia marcescens* et *Enterobacter cloacae* (Philippon *et al.*, 1989), la BLSE SHV-5 chez *S. marcescens* (Gianneli *et al.*, 1994), *E. cloacae* et *Citrobacter freundii* (Venezia *et al.*, 1995), la BLSE SHV-12 chez *C. freundii* et *E. cloacae* (Gangoué Piéboji, 2000).

La BLSE du type CTX-M a été rapportée pour la première fois en Europe Occidentale en 1989 et c'était la CTX-M-1. Cette enzyme a été détectée en Allemagne, en Italie et en France chez des espèces variées d'Entérobactéries (Bauernfeind *et al.*, 1990, Bernard *et al.*, 1992 ; Saladin *et al.*, 2002, Pagani *et al.*, 2003). La BLSE CTM-X-15 comme les BLSE CTX-M-16 et 19 confèrent une forte résistance à la ceftazidime que d'autres BLSE du type CTX-M (Poiret *et al.*, 2001 ; Bonnet, 2004). Toutefois nous avons observé que les souches productrices de cette BLSE ont été sensibles ou modérément résistantes à la ceftazidime. La CTX-M-15 qui diffère de la CTX-M-3 par la mutation d'un acide aminé (Aspartate-240-glycine) a été identifiée pour la première fois en Inde et au Japon et a été par la suite mise en évidence dans plusieurs autres pays (Canada, Russie, Bulgarie, Pologne, France, Royaume uni, Turquie et Taiwan) (Bonnet, 2004 ; Yu *et al.*, 2003, Musththaq *et al.*, 2003 ; Latrigue *et al.*, 2003). Nous avons décrit pour la première fois ces enzymes au Cameroun. Ces deux enzymes font parti du groupe de CTX-M-1 qui possède 86% d'identité avec les acides aminés de la β -lactamase chromosomique KLUC-1 de *Kluyvera cryocrescens*. Trois autres types de CTX-M

ont été rapportés en Afrique, la CTX-M-2 (Afrique du Sud) la CTX-M-3 (RCA) (Frank *et al.* 2006) et la CTX-M-12 (Kenya) (Kariuki *et al.*, 2001 ; Paterson *et al.*, 2003). Les gènes *bla*_{CTX-M-15} que nous avons décrit ont été soit associés aux gènes *bla*_{TEM-1} et/ou *bla*_{OXA-30} comme c'est souvent le cas dans les autres études (Bonnet, 2004).

L'étude de l'environnement du gène *bla*_{CTX-M-15} dans les plasmides pYC-5b et pYC-14 a permis de mettre en évidence la présence de la séquence d'insertion *ISEcpI*. Cette séquence d'insertion est associée aux groupes majeurs d'évolution (CTX-M-1, CTX-M-2 et CTX-M-9) du gène *bla*_{CTX-M} (Bonnet, 2004). La présence de 5 bp aux extrémités de l'élément *ISEcpI-bla*_{CTX-M-15} et la ressemblance de son extrémité droite au IRR de *ISEcpI* sont indicatrices d'une transposition. Les caractéristiques similaires de la séquence de l'élément *ISEcpIB-bla*_{CTX-M-19} récemment décrit mènent à l'hypothèse selon laquelle *ISEcpI* médie la régularité du processus de transposition (Poirel *et al.*, 2003). Cependant, les IRR putatif de ces deux éléments ont au moins 60% d'homologie avec la région correspondante de l'IRR et diffèrent aussi entre eux par 9 nucléotides (50% d'homologie). Par conséquent, la possibilité d'un même mécanisme de fin de transposition ne peut être définitivement exclue (P.D.. Stapleton, Abstr 39th Intersc. Conf. Antimicrob. Agents Chemother., abstr 1457, 1999).

Des groupes géographiques et temporels des gènes *bla*_{CTX-M} identiques et portés par des plasmides apparemment différents ont été également rapportés dans bon nombre d'études dont Bonnet (2004) fait la revue. Notamment, l'homologie de séquence du locus codant le CTX-M dans les plasmides pYC-5b et pYC-14 qui se prolonge au-delà de l'élément *ISEcpI-bla*_{CTX-M-15}, incluant des parties des segments de flanquement du Tn2. Récemment, Lartigue *et al.*, (2004) ont décrit chez les bactéries *E. coli* isolées en France et en Inde des plasmides portant l'élément *ISEcpI-bla*_{CTX-M-15} inséré dans le *tnpA* du transposon Tn2. Par ailleurs la recherche dans le GenBank a révélé la présence d'un plasmide de *E. coli* isolé du Canada (pc15-1a) qui contenait aussi *ISEcpI-bla*_{CTX-M-15} inséré dans le Tn2 (des nucléotides 17077 à 23482 dans la séquence de N° d'accèsion AY458016 [M.R. Mulvey *et al.*, données non publiées]). Cette séquence est l'homologue de celle trouvée dans le plasmide pYC-5b, à l'exception de l'absence de *IS26*, à l'extrémité gauche. En outre l'analyse des profils de restriction a montré une différence entre les profils des deux plasmides. Partant du fait qu'il n'existe pas de marqueur du site de sélectivité sur *ISEcpI*, on peut émettre l'hypothèse selon laquelle le plasmide portant *bla*_{CTX-M-15} discuté dans ces travaux a divergé d'un plasmide ancestral portant *ISEcpI-bla*_{CTX-M-15} ou que la séquence *ISEcpI-bla*_{CTX-M-15} a été acquise indépendamment en tant que partie d'un grand élément mobile.

L'inhibition des β -lactamases P99 et OXA-10 par les extraits et produits purs respectifs de *G. lucida* et *B. micrantha* a été rapporté pour la première fois dans cette étude. Les informations phytochimiques sur les deux plantes étudiées sont rares. De plus dans la littérature aucune étude sur l'activité inhibitrice des β -lactamases par des composés issus des plantes n'a été trouvée. Toutefois, l'inhibition serait due à des composés de la classe des phénols. Les phénols sont reconnus comme des inhibiteurs des protéases (Cowan, 1999). Certaines études ont révélés la présence des dérivés cycloartane, d'anthocyane, de flavonoïdes, des saponines et triterpènes dans *G. lucida* (Nyemba *et al.*, 1990 ; Guedje, 2002), de friedeline, taraxerone, epifriedelinol et taraxerol dans *B. micrantha* (Pegel & Roger, 1968 ; Kouam *et al.*, 2005). Il est fort probable que c'est un de ces composés qui serait responsable de l'activité anti- β -lactamase observée. En plus, *B. micrantha* est connu avoir des propriétés antimicrobiennes (Abo & Ashidi, 1999 ; Lin *et al.*, 2002 ; Samie *et al.*, 2005). La détermination des principes actifs de ces deux plantes serait un point de départ pour le développement des inhibiteurs et/ou des inactivateurs des β -lactamases.

Etant donnée que jusqu'à nos jours il n'existe pas un inhibiteur qui inhiberait toutes les classes de β -lactamases, les inhibiteurs classiques devenant de plus en plus inactifs, il serait intéressant d'explorer cette piste de plantes médicinales. Peut-être que l'inhibiteur miracle viendra de ces plantes.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce travail avait pour objectifs de caractériser les BLSE produites par les Entérobactéries isolées des patients hospitalisés à l'HCY et de déterminer l'activité inhibitrice de deux plantes médicinales, *G. lucida* et *B. micrantha* sur les β -lactamases.

Les résultats exposés permettent de dégager un certains nombre d'éléments. Les Entérobactéries isolées des patients hospitalisés présentent des niveaux de résistance élevés, variant de 67%-90% aux pénicillines (amoxicilline, amoxicilline/acide clavulanique, pipéracilline) à la céphalosporine de première génération (céfazoline), et au triméthoprim/sulfaméthoxazole. Toutefois, le carbapénème (imipénème) suivi de la fluoroquinolone (ofloxacine) et de la céphalosporine de 3^{ème} génération (ceftazidime) sont les antibiotiques les plus actifs sur ces bactéries.

La prévalance des Entérobactéries productrices de BLSE est de 12% répartie comme suit : *Klebsiella* (18,8%), *Citrobacter* (17,6%), *E. coli* (14,3%), *Enterobacter* (6,5%) et *Proteus* (1,8%). La majorité d'Entérobactéries possédant ce phénotype est constituée de *E. coli* (44,7%) et *Klebsiella* (36,8%). L'utilisation de la céfotaxime, ceftriaxone, ceftazidime et aztreonam lors de la réalisation du test de double synergie accroît considérablement la sensibilité de ce test et permet une meilleure détection des BLSE.

Les BLSE étudiées proviennent des souches isolées en majorité des urines (57%) et des pus (29%) provenant des patients hospitalisés en chirurgie (42,2%) et Soins intensifs (36,8%). Environ 42% des souches étudiées possèdent des BLSE portées par des plasmides conjugatifs. L'utilisation abusive et intensive de la gentamicine et du triméthoprim/sulfaméthoxazole contribuerait à l'apparition des souches productrices de BLSE à HCY.

Les BLSE que nous avons étudiées sont du groupe 2 be de Bush-Jacoby-Medeiros et de la classe A de Ambler car elles sont inhibés par l'acide clavulanique et sensibles à la céfoxitine. Leur point isoélectrique est >8 , dont 8,2 pour SHV-12, 8,4 pour CTX-M-1 et 8,8 pour CTX-M-15.

La dissémination des BLSE à l'HCY se réalise de deux manières, le transfert d'une souche d'un patient à un autre et le transfert du plasmide d'une espèce à une autre.

Les différents types de BLSE que nous avons mis en évidence sont SHV-12 produite par les souches de *E. coli*, *Klebsiella* spp. *Citrobacter* spp. et *Enterobacter* spp., CTX-M-1

produite par *E. coli*, CTX-M-15 produites par les souches de *E. coli* et de *K. pneumoniae*. Ces différentes BLSE sont rapportées au Cameroun pour la première fois.

L'environnement du gène *bla*_{CTX-M-15} a montré que ce gène est porté par la séquence d'insertion *ISEcp1*. Cette séquence serait impliquée dans sa dissémination.

Les extraits bruts de *G. lucida* et *B. micrantha* à la concentration de 6 mg/ml ont montré une forte activité inhibitrice sur les différentes classes (A, B, C, et D) des β-lactamases. Cette activité est bien conservée après élimination des tanins des extraits. L'extrait brut de *B. micrantha* est très actif sur OXA-10 (25% d'activité résiduelle en présence de 0,03 mg/ml de l'extrait brut) alors que l'extrait brut de *G. lucida* est très actif sur P99 (43% d'activité résiduelle avec 0,012 mg/ml de l'extrait).

L'activité inhibitrice des extraits bruts a été confirmée par celle des produits purifiés, avec $CI_{50} = 0,03$ mg/mg (*G. lucida* sur P99) et $CI_{50} = 0,09$ et $0,11$ (*B. micrantha* sur OXA-10). Quelque soit le produit, l'activité inhibitrice augmente avec le temps d'incubation.

Vu les résultats obtenus, cette étude mériterait d'être poursuivie. Il serait intéressant de connaître la prévalence et les types de BLSE dans d'autres hôpitaux de Yaoundé et du Cameroun afin de mieux assurer la prise en charge des infections causées par des souches productrices de ces enzymes. Les plantes médicinales constituent un axe de recherche des inhibiteurs des β-lactamases. Les produits purs isolés sont en voie d'analyse pour la détermination de leur structure et pour leur identification. Leur activité sera testée sur les autres β-lactamases et les mécanismes d'inhibition seront étudiés.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Abo, K.A., J.S. Ashidi. 1999. Antimicrobial screening of *Bridelia micrantha*, *Alchornea cordifolia* and *Boerhavia diffusa*. *Afric J. Med. Medi. Sc.*, 28: 167-169.
2. Adjanohoun, J.E., A.boubakar,N., Dramane, K., Ebot, M.E., Ekpere, J.A., Enow-Orock, E.G., Focho, D., Gbile, Z.O., Kamanyi, I.,Kamsu Kom, J., Keita, A., M,benkum,T., Mbi, C.N., Mbiele, A.L., Mbome, I.L., Mubiru, N.K., Nancy, W.L., Nkongmeneck,B., Satabie, B., Sofowora,A., Tamze, V., and Wirmum, C.K. (1996). Contribution to ethnobotanical and floristic studies in Cameroon. Scientific Technical and Research Commission, Organization of African Unity, p 641.
3. Aibinu, I. E., Ohaegbulam, V. C., E. Adenipekun, A., Ogunsola, F. T., Odugbemi, T. O. & B. J. Mee. 2003. Extended-spectrum beta-lactamase enzymes in clinical isolates of *Enterobacter* species from Lagos, Nigeria. *J. Clin. Microbiol.*, 41 : 2197–2200.
4. AitMhand, R., Soukri, A., Moustou, N., Amarouch, H., ElMdaghri, N., Sirot, D., & M. Benbachir. 2002. Plasmid-mediated TEM-3 extended-spectrum beta-lactamase production in *Salmonella typhimurium* in Casablanca. *J. Antimicrob. Chemother.*, 49:169–172.
5. Ambler, R. P. 1980. The structure of β -lactamases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. (Biol.)* 289: 321-331.
6. Archibald, L., Phillips, L., Monnet, D., Mac Govan, J. E., Tenover, Jr, F. & R. Gaynes. 1997 Antimicrobial resistance in isolates from in patients and outpatients in the United States. Increasing importance of the intensive care unit. *Clinic. Infect. Dis.* 24 : 211-215.
7. Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., & K. Struhl. 1994. Current protocols in molecular biology. Wiley, New York, 24-30.
8. Bauernfeind, A., Grimm, H. & S. Schweighart. 1990. A new plasmidic cefotaximase in clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection* 18: 294-298.
9. Ben Hassen, A., Fournie, G. r, Kechrid, A., Fendri ,C., Ben Redjeb, S. & A. Philippon. 1990. Re'sistance enzymatique au ce'fotaxime chez cinquante-six souches de *Klebsiella* spp., *Escherichia coli* et *Salmonella* spp. dans un hopital tunisien (1984–1988). *Pathol. Biol.* 38:464–469.
10. Ben-Hamouda, T., Foulon,T. & K. Ben-Mahrez. 2004. Involvement of SHV-12 and SHV-2a encoding plasmids in outbreaks of extended-spectrum beta-lactamase-

- producing *Klebsiella pneumoniae* in a Tunisian neonatal ward. *Microb. Drug Resist.* 10:132–138.
11. Ben Redjeb, S., Fournie G., Mabilat, C., Ben Hassen, A. & A. Philippon. 1990. Two novel transferable extended-spectrum beta-lactamases from *Klebsiella pneumoniae* in Tunisia. *FEMS Microbiol. Lett.*, 55:33–38.
 12. Bedenic, B., Randegger, C. C., Stobberingh, E., & H. Hächler. 2001. Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases from *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in Zagreb, Croatia. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 20: 505-508.
 13. Bergogne-Bérézin, E., Decré, D. & M.-L. Joly-Guillou. 1993 Infections bactériennes nosocomiales opportunistes dues à des bactéries multirésistantes-traitement et prévention. *J. Antimicrob. Chemother.* 32 : 39-47.
 14. Bermudes, H., Arpin, C., Inde, F. El Harrif, Z., Bebear, C., & C. Quentin. 1997. Molecular epidemiology of an outbreak due to expanded spectrum betalactamase producing Enterobacteriaceae in French hospital. *Eur. J. Microbiol. Infect. Dis.* 16 : 523-259.
 15. Bernard, H., Tancrede, C., Livrelli, V., Morand, A., Barthelemy, M. & R. Labia. 1992. A novel plasmid-mediated extended-spectrum β -lactamase not derived from TEM- or SHV-type enzymes. *J. Antimicrob. Agents Chemother.* 29: 590-592.
 16. Betti J.L. 2004. An ethnobotanical study of medicinal plants among the Baka pygmies in the Dja Biosphere reserve, Cameroon. *African Study Monographs*, 25: 1-27
 17. Blomberg, B., Juren, R., Manji, K.P., Tamin, B.S., Mwakagile, D.S.M., Urassa, W.K., Fataki, M., Msangi, V., Tellevik, M.G., Maselle, S.Y. & Y. Langeland. 2005. High rate of fatal cases of pediatric septicaemia caused by Gram-negative bacteria with extended-spectrum beta-lactamases in Dar Es Salaam, Tanzania. *J. clin. Microb.*, 43 : 745-749.
 18. Bonnefoy, A., Dupuis-Hamelin, C., Steier, V., Delachaume, C., Seys, C., Stachyra, T., Fairley, M., Guitton, M & M. Lampilas. 2004. In vitro activity of AVE1330A, an innovative broad-spectrum non- β -lactam β -lactamase inhibitor. *J. Antimicrob. Chemother.*, 54 : 410-417.
 19. Bonnet, R. 2004. Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48: 1-14.

20. Bouallègue-Godet, O., Ben Salem, Y., Fabre, L., Demartin, M., Grimont, P.A.D., Mzoughi, R., & F.-X. Weill. 2005. Nosocomial Outbreak Caused by *Salmonella enterica* Serotype Livingstone Producing CTX-M-27 Extended-Spectrum β -Lactamase in a Neonatal Unit in Sousse, Tunisia. *J. Clin. Microb.*, 43: 1037-1044.
21. Bouchillon, S.K., Johnson, B.M., Hobana, D.J., Johnson, J.L., Dowzicky, M.J., Wu, D.H., Visallic, M.A. & P.A. Bradford. 2004. Determining incidence of extended spectrum β -lactamase producing Enterobacteriaceae, vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in 38 centres from 17 countries: the PEARLS study 2001–2002. *J. Antimicrob. Agents*, 24: 119-124.
22. Bradford, P. A. 1999. Automated thermal cycling is superior to traditional methods for nucleotide sequencing of bla (SHV) genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43 : 2960-2963.
23. Bradford, P. A. 2001. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin. Microbiol. Rev.*, 14:933–951.
24. Brin□as, L., Moreno, M. A., Teshager, T., Zarazaga, M., Sáenz, Y., Porrero, C., Dominguez, L. & C. Torres. 2003. Beta-lactamase characterization in *Escherichia coli* isolates with diminished susceptibility or resistance to extended-spectrum cephalosporins recovered from sick animals in Spain. *Microb. Drug Resist.* 9: 201-09.
25. Brown, D. F., Andrews, J., King, A., & A. P. MacGowan. 2000. Detection of extended-spectrum beta-lactamases with E-test and double-disc potentiation methods. *J. Antimicrob. Chemother.* 46:327–328.
26. Bush, K. 2002. The impact of beta-lactamases on the development of novel antimicrobial agents. *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3:1284–1290.
27. Bush, K., G. A. Jacoby, & A. A. Medeiros. 1995. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:1211–1233
28. Cardinale, E., P. Colbachini, J. D. Perrier-Gros-Claude, A. Gassama, & A. Aidara-Kane. 2000. Dual emergence in food and humans of a novel multiresistant serotype of *Salmonella* in Senegal: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype 35: C: 12. *J. Clin. Microbiol.* 39: 2373-2374.
29. Chanawong, A., M'Zali, F. H., Heritage, J., Lulitanond, A. & P. M. Hawkey. 2001. SHV-12, SHV-5, SHV-2a and VEB-1 extended-spectrum beta-lactamases in Gram-

- negative bacteria isolated in a university hospital in Thailand. *J. Antimicrob. Chemother.* 48: 839-852.
30. Chanawong, A., M'Zali, F. H., Heritage, J., Xiong, J. H. & P. M. Hawkey. 2002. Three cefotaximases, CTX-M-9, CTX-M-13, and CTX-M-14, among Enterobacteriaceae in the People's Republic of China. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 630-637.
 31. Chippaux, J.P., Rakotonirina, V.S., Rakotonirina, A. & G. Dzikouk. 1997. Drug or plant substance which antagonize venoms or potentiate antivenoms. *Bull. Soc. Path. Exo.*, 90 : 282-285.
 32. Concha, N.O., Janson, C.A., Rowling, P., Pearson, S., Cheever, C.A., Clarke, B.P., Lewis, C., Galleni, M, Frère, J.M., Payne, D.J., Bateson, J.H. & S. S. Abdel-Megui. 2000. Crystal Structure of the IMP-1 metallo β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and Its Complex with a mercaptocarboxylate inhibitor: binding determinants of a potent, broad-spectrum inhibitor. *Biochemistry*, 39, 4288-4298.
 33. Cormican, M. G., Marshall, S. A. & R. N. Jones. 1996. Detection of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing strains by the Etest ESBL screen. *J. Clin. Microbiol.* 34:1880–1884.
 34. Cosgrove, S. E., Kaye, K. S., Eliopoulous, G. M. & Y. Carmeli. 2002. Health and economic outcomes of the emergence of third-generation cephalosporin resistance in *Enterobacter* species. *Arch. Intern. Med.* 162:185–190.
 35. Coudron P. E., Moland E. S., & C. C. Sanders . 1997. Occurrence and detection of extended-spectrum β -lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae* at a veterans medical center : seek and you may find. *J. Clin. Microbiol.* 35 : 2593-2597.
 36. Coudron, P. E., Moland, E. S., & K. S., Thomson. 2000. Occurrence and detection of AmpC beta-lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis* isolates at a Veterans Medical Center. *J. Clin. Microbiol.* 38: 1971-1976
 37. Cowan, M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinic. Microbiol. Rev.* 12, 564-582.
 38. Decousser, J. W., Poirel, L. & P. Nordmann. 2001. Characterization of a chromosomally encoded extended-spectrum class A β -lactamase from *Kluyvera cryocrescens*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:3595–3598.

39. Dijkstra, A.J. & W. Keck. 1996. Peptidoglycan as a barrier to transenvelope transport. *J. Bacteriol.* 178 : 5555-5562.
40. Dhawan, B., Bonnet, R., Shukla, N. K., Mathur, P., Das, B. K. & A. Kapil. 2003. Infection with an extended-spectrum beta-lactamase-producing strain of *Serratia marcescens* following tongue reconstruction. *J. Clin. Microbiol.* 41: 2233-2234.
41. Doi, Y., Wachino, J-I., Ishiguro, M., Kurokawa, H., Yamane, K., Shibata, N., Shibayama K., Yokoyama, K., Kato, H., Yagi, T. & Arakawa, Y. 2004. Inhibitor-sensitive AmpC β -lactamase variant produced by an *Escherichia coli* clinical isolate resistant to oxyiminocephalosporins and cephamycins. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 48: 2652-2658.
42. Duke, J.A. 1990. Promosing phytochemicals. In : *Advances in new crops*. Janick J. and Simon. Timber press, Potland. 491-498.
43. El-Karsh, T., Tawfik, A. F., Al-Shammary, F. Al-Salah, S. kambal, A. M. & A. Shibl. 1995. Antimicrobial resistance and prevalence of extended-spectrum β -lactamase among clinical isolates of Gram-negative bacteria in Riyadh. *J. Chemother.* 7 : 509-514.
44. Essack, S. Y., Hall, L. M., Pillay, D. G., McFadyen, M. L. & D. M. Livermore. 2001. Complexity and diversity of *Klebsiella pneumoniae* strains with extended-spectrum beta-lactamases isolated in 1994 and 1996 at a teaching hospital in Durban, South Africa. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:88–95.
45. Farmer, J. J., III 1999. *Enterobacteriaceae*: introduction and identification, p. 442–458. In P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R. H. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
46. Farmer, T. H., Page, J. W. J., Payne, D. J. & J. C. Knowles. 1994. Kinetic and physical studies of B-lactamase inhibition by a novel penem BRL 42715. *Biochem. J.* 303:825-830.
47. Frank, T., Arlet, G., Gautier, V., Talarmin, A. & R. Bercion. 2006. Extended-spectrum β -Lactamase-producing *Enterobacteriaceae*, Central African Republic. *Emerging Infect. Dis.* 12: 863-865
48. Frère, J.-M. & B. Joris. 1985. Penicillin-sensitive enzymes in peptidoglycan synthesis, *CRC Crit. Rev. Microbiol.*, 11: 299-396.

49. Frère, J.-M., Ghuysen, J.-M. & M.Iwatsubo. 1975. Kinetics of the interaction between the exocellular DD-carboxypeptidase-transpeptidase from *Streptomyces* R39, *Eur. J. Biochem.* 57 : 343- 351.
50. Fuad, N., Frère, J.-M., Ghuysen, J.-M., Duez, C. & M., Iwatsubo. 1976. Mode of interaction between beta-lactam antibiotics and the exocellular DD-carboxypeptidase-transpeptidase from *Streptomyces* R39 and beta-lactam antibiotics. A choice of models, *Biochem. J.* 155 : 623-629
51. Galleni, M., Lamotte-Brasseur, J., Raquet, X., Dubus, A., Monnaie, D., Knox, J.R. & J.- M.Frère. 1995. The enigmatic catalytic mechanism of active-site serine β -lactamases, *Biochem. Pharmacol.* 49 : 1171-1178.
52. Galleni, M., Lamotte-Brasseur, J., Rossolini, G.M., Spencer, J., Dideberg, O., J.M. Frère & the metallo- β -lactamase working group. 2001. Standard numbering scheme for class B β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45 : 660-663.
53. Galleni, M., & J.M. Frère. 1988. A survey of the kinetic parameters of class C β -lactamases. I. Penicillins. *Biochemistry J.* 255, 119-122
54. Gangoué Piéboji J. 2000. Résistance des bacilles à Gram négatif aux antibiotiques: prévalence et caractérisation des β -lactamases à spectre élargi à l'Hôpital Central de Yaoundé. Thèse de Doctorat de 3e cycle, Université de Yaoundé I, 210 p.
55. a. Gangoué-Piéboji, J., Miriagou, V., Vourli, S., Tzelepi, E., Ngassam, P., &L.S. Tzouvelekis. 2005. Emergence of CTX-M-15producing Enterobacteria in Cameroon and characterization of blaCTX-M-15-carrying element. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 49: 441-443.
56. b. Gangoué-Piéboji, J., Bedenic, B., Koulla-Shiro S., Randegger, C., Adiogo, D., Ngassam, P., Ndumbé, P., & H. Hächler. 2005. Extended-Spectrum- β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in Yaounde, Cameroon. *J. Clin. Microb.*, 43: 3273-3277.
57. Ghuysen, J.-M. 1991. Serine beta-lactamases and penicillin-binding proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* 45 : 37-67.
58. Ghuysen, J.-M. 1994. Molecular structures of penicillin-binding proteins and β -lactamases, *Trends Microbiol.* 2 : 372-380.
59. Ghuysen, J.-M., Frère, J.-M., Leyh-Bouille, M., Nguyen-Distèche, M. & J. Coyette. 1986. Active-siteserine D-alanyl-D-alanine-cleaving-peptidase-catalysed acyl-transfer reactions, *Biochem. J.* 235 : 159-165.

60. Gianneli, D., Tzelepi, E., Tzouvelekis, L. S. Mentis, A. F. & C. Nikolopoulou. 1994. Dissemination of cephalosporin-resistant *Serratia marcescens* strains producing a plasmidic SHV type β -lactamase in Greek hospitals. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 13 : 764-767
61. Guedje, N.M. 2002. La gestion des populations d'arbres comme outil pour une exploitation durable des produits forestiers non ligneux : l'exemple de *Garcinia lucida* (Sud-Cameroun). The Tropenbos-Cameroon Program, Kribi and Université Libre de Bruxelles, Brussels, 2002. Tropenbos-Cameroon, 5 : 223 p.
62. Fauci, A. S. 2001. Infectious diseases: considerations for the 21st century. *Clin. Infect. Dis.* 32 : 675-685.
63. Hakenbeck, R. & J. Coyette. 1998. Resistant penicillin-binding proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* 54 : 332-340.
64. Hammond, D.S. Schooneveldt, J.M., Nimmo, G.R., Huygens, F. and P.M. Giffard. 2005. *ba_{SHV}* genes in *Klebsiella pneumoniae*: different allele distributions are associated with different promoters within individual isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 49: 256-263.
65. Harz, H. Burgdorf, K. & J.V. Holtje. 1990. Isolation and separation of the glycan strands from murein of *Escherichia coli* by reversed – phase high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* ,190 : 120-128.
66. Ho, P. L., Tsang, D. N. C., Que, T. L., Ho, M. & K. Y. Yuen. 2000. Comparison of screening methods for detection of extended-spectrum β -lactamases and their prevalence among *Escherichia coli* and *Klebsiella* species in Hong Kong. *APMIS*, 108:237–240.
67. Howard, C., Daal, A., Kelly, G., Schooneveld, J., Nimmo, G. & M. P. Giffard. 2002. Identification and minisequencing-based discrimination of SHV β -lactamases in nosocomial infection-associated *Klebsiella pneumoniae* in Brisbane, Australia. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 659-664
68. Huang, W., Zhang, Z., & T. Palzkill. 2000. Design of potent β -lactamase inhibitors by phage display of β -Lactamase inhibitory protein. *J. Biol. Chem.*, 275: 14964-14968.
69. Huovinen P. 1997. Increases in rates of resistance to trimethoprim. *Clin. Infect. Dis.* 24:S63-S66.

70. Huovinen, P., Sundström, L., Swedberg, G. & O.Sköd. 1995. Trimethoprim and sulfonamide resistance. *Antimicrob Agents Chemother*,39:279-89.
71. Iwu, M.W., Duncan, A.R. & C.O. Okunji. 1999. New antimicrobials of plant origin. In: Janick, J. (ed.), *Perspectives on New Crops and New uses*. ASHS Press, Alexandria, VA, pp. 457-462.
72. Jacoby, G. A. & P. Han. 1996. Detection of extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 34 : 908-911.
73. Jacoby, G. A. 1994. The genetics of extended-spectrum beta-lactamases. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 13 : 2-11
74. Jacoby, G. A. 1997. Extended-spectrum β -lactamases and other enzymes providing resistance to oxymino- β -lactams. *Infect. Dis. Clin. North America.* 11 : 875-887
75. Jarlier, V., Nicolas, M. -H., Fournier, G. & A. Philippon. 1988. Extended broad - spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in *Enterobacteriaceae* : hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev. Infect. Dis.* 10 : 867-878.
76. Jarlier, V., Nicolas, M. H., Fournier, G., & A. Philippon. 1988. Extended broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev. Infect. Dis.* 10:867–878.
77. Jones, R. N., Pfaller M. A., Doern G. V., Erwin, M. E., & R. J. Hollis. 1998. Antimicrobial activity and spectrum investigation of eight broad spectrum betalactam drugs : a surveillance trial in 102 medical centres in the United states. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 30 : 215-228.
78. Kariuki, S., Corkill, J. E., Revathi, G., Musoke, R. & C. A. Hart. 2001. Molecular characterization of a novel plasmid-encoded cefotaximase (CTXM-12) found in clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates from Kenya. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:2141–2143.
79. Kim, J., Kwon Y., Pai, H., Kim, J. W. & D. T. Cho. 1998. Survey of *Klebsiella pneumoniae* strains producing extended-spectrum beta-lactamases: prevalence of SHV-12 and SHV-2a in Korea. *J. clin. Microbiol.* 36: 1446-1449.

80. Kliebe, C., B. A. Nies, J. F. & R.M Meyer,. Tolxdorff-Neutzling, and B. wiedemann. 1985. Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 28: 302-307.
81. Knothe, H. P. Shah, V., Kreméry, M. & S. Mitsuhashi. 1983. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection* 11: 315-317.
82. Kolar, M., Urbanek, K. & T.Latal. 2001. Antibiotic selective pressure and development of bacterial resistance. *Int J Antimicrob Agents*,17:357-63.
83. Kouam, S.F., Flörke, U., Krohm, K., Akhtar, M.N., Ngadjui, B.T. and Abegaz, B.M. 2005. 2- β -taraxerol from *Bridelia micrantha*. *Acta crystallo.* 61, 599-600
84. Koulla-Shiro, S., Boye, C.S., Dosso, M. & the members of the Palm Project. 1998. Surveillance of antimicrobial susceptibility of Gram negative pathogens responsible for nosocomial infections in West Africa (Abstract number E-95). San Diego, California: 42nd ICAAC; p. 197.
85. Kruger, T., Szabo, D., Keddy, K.H., Deeley, K., Marsh, J.W., Hujer A.M., Bonomo, R.A. &D.L. Paterson. 2004. Infections with Nontyphoidal *Salmonella* Species Producing TEM-63 or a Novel TEM Enzyme, TEM-131, in South Africa. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 48: 4263-4270
86. Kunin, C. M., K. S. Johansen, A. M. Worning, & F. D. Daschner. 1990. Report of a symposium on use and abuse of antibiotics worldwide. *Rev. Infect. Dis.* 12: 12- 19.
87. Lakaye, B., Dubus, A., Lepage, S., Gros Lambert, S. & J. M. Frère. 1999. When drug inactivation renders the target irrelevant to antibiotic resistance: a case story with β -lactams. *Mol. Microbiol.* 31 : 89–101.
88. Lamikamra, A & R.B. Ndep. 1989. Trimethoprim resistance in urinary tract pathogens in two Nigerian hospitals. *J Antimicrob Chemother.*, 23:151-154.
89. Laraki, N., Franceschini, N., Rossolini, G.M., Santucci, P., Meunier, C., de Pauw, E., Amicosante, G., Frère, J.-M, & M. Galleni. 1999. Biochemical characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* 101/1477 metallo- β -Lactamase IMP-1 produced by *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 43: 902-906
90. Latrigue, M.F., Poiret, L., Heritier, C., Tolún, V. & P. Nordmann. 2003. First description of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* in Turkey. *J. Antimicrob. Chemother.* 52: 315-316.

91. Lartigue, M. F., Poirel, L. & P. Nordmann. 2004. Diversity of genetic environment of *bla*CTX-M genes. *FEMS Microbiol. Lett.* 234:201–207.
92. Ledent, Ph., Raquet, X., Joris, B., Van Beeumen, J., & J.M. Frère. 1993. A comparative study of class-D β -lactamases. *BiochemistryJ.* 292: 555-562
93. Lesch ,C.A., Itokazu, G.S., Danziger, L.H. & R.A. Weinstein. 2001. Multi-hospital analysis of antimicrobial usage and resistance trends. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* , 41:149-54.
94. Lin, J., Puckree, T., T.P. Mvelase. 2002. Anti-diarrhoeal evaluation of some medicinal plants used by Zulu traditional healers. *J. Ethnopharm.*, 79: 53-56.
95. Linscott, A.J., & W.J. Brown. 2005. Evaluation of four commercially available extended-spectrum β -lactamase phenotypic confirmation tests. *J. Clin. Microbiol.*, 43: 1081-1085.
96. Livermore, D. M. 1995. β -lactamase mediated resistance: past, present and future. *J. Infect. Dis. Soc.* 6 : 75-83.
97. Makanera, A., Arlet, G., Gautier, V. & M. Manai. 2003. Molecular Epidemiology and Characterization of Plasmid-Encoded β -Lactamases Produced by Tunisian Clinical Isolates of *Salmonella enterica* Serotype Mbandaka Resistant to Broad-Spectrum Cephalosporins. *J. Clin. Microbiol.*, 41 : 2940-2945.
98. Mahillon, J. & M. Chandler. 1998. Insertion sequences. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:725–774.
99. Martinez-Martinez, L., Hernandez-Alles, S., Alberti, S., Tomas, J. M., Benedi, V. J. & G. A. Jacoby, J.A. 1996. In vivo selection of porin-deficient mutants of *Klebsiella pneumoniae* with increased resistance to cefoxitin and expanded-spectrum cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40 : 342-348.
100. Matagne, A., Lamotte-Brasseur J.& J-M. Frère. 1998. Catalytic properties of class A β -lactamases: efficiency and diversity. *Biochem. J.*, 330: 581-598.
101. Mathew, M., Harris, A. M., Marshall, M. J. & G. W. Ross. 1975. The use of analytical isoelectric focusing for detection and identification of β -lactamases. *J. Gen. Microbiol.* 88:169–178.
102. Mavroidi, A., Tzelepi, E., Miriagou, V., Gianneli, D., Legakis, N.J. & L.S. Tzouvelekis. 2002. CTX-M-3 β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* from Greece. *Microb. Drug Resist.* 8: 34-37.

103. Medeiros, A. A., O. Brien, T. F., Rosenberg, E. Y. & H., Nikaido. 1987. Loss of OmpC porin in a strain of *Salmonella typhimurium* causes increased resistance to cephalosporins during therapy. *J. Infect. Dis.* 156: 751-757.
104. Miller, L. A., Ratnam, K., & D. J. Payne. 2001. Beta-lactamase-inhibitor combinations in the 21st century: current agents and new developments. *Curr. Opin. Pharmacol.* 1:451-458.
105. Mollard, C., Moali, C., Papamicael, C., Damblon, C., Vessilier, S., Amicosante, G., Schofield, C.J., Galleni, M., Frère J.M., & G.C.K. Roberts. 2001. Thiomandelic acid, a broad spectrum inhibitor of zinc β -Lactamases. Kinetic and spectroscopic studies. *J Biol. Chem.*, 276 : 45015-45023.
106. Monnet, D.L., Archibald, L.K., Phillips, L., Tenover, F.C., McGowan, J.E. & R.P. Gaynes. 1998. Antimicrobial use and resistance in eight US hospitals: complexities of analysis and modeling. *Infect Control Hosp Epidemiol*;19:388-394.
107. Mulvey, R.M., Bryce, E., Boyd, D., Ofner-Agostini, M., Christianson, S., Simor, E.S., Paton, S., & the Canadian Hospital Epidemiology Committee of The Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program, Health Canada. 2004. Ambler Class A Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in Canadian Hospitals. *Antimicrob Agents Chemoter.*, 48: 1204-1214.
108. Mushtaq, S., Woodford, N., Potzand, N. & D. M. Livermore. 2003. Detection of CTX-M-15 extended-spectrum β -lactamase in the United Kingdom. *J. Antimicrob. Chemother.* 52:528-529
109. Nanninga, N. 1991. Cell division and peptidoglycan assembly in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 5:791-795.
110. Nanninga, N. 1998. Morphogenesis of *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62, 110-129.
111. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1999. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; ninth informational supplement. Approved standard M100-S9. NCCLS, Wayne, Pa.
112. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2005. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 15th informational supplement (M100-S15). National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
113. Neonakis, I.K., Scoulica, E. V., Dimitrio, S. K., Gikas, A. I. & Y. J. Tselentis. 2003. Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases produced by clinical

- isolates in a university hospital in Greece: detection of SHV-5 in *Pseudomonas aeruginosa* and prevalence of SHV-12. *Microb. Drug Resist.* 9: 161-165.
114. Nikaido, H. 1998. Multiple antibiotic resistance and efflux. *Curr. Opin. Microbiol.* 1:516–523.
115. Nishida, K., Kunugita, C., Uji, T., Higashitani, F., Hyodo, A., Unemi, N., Maiti, S.M., Phillips, O.A., Spevak, P., Atchison, K.P., Salama, S.M., Atwal, H. & R.G. Micetich. 1999. In Vitro and In Vivo Activities of Syn2190, a Novel β -Lactamase Inhibitor. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43: 1895-1900.
116. Normark, B. H. & S. Normark. 2002. Evolution and spread of antibiotic resistance. *J Intern. Med.*, 252 : 91-106.
117. Nüesch-Inderbilen, M. T., Hächler, H. & F. H. Kayser. 1996. Detection of Genes coding for extended-spectrum SHV beta-lactamases in clinical isolates by a molecular genetic method, and comparison with the E test. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 15: 398-402.
118. Nüesch-Inderbilen, M. T., Kayser, F. H. & H. Hächler. 1997. Survey and molecular genetics of SHV β -lactamases en enterobacteriaceae in Switzerland: two novel enzymes, SHV-11 and SHV-12. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 41: 943-949.
119. Nyemba, A.M., Mpondo, T.N., Connolly, J.D., D.S. Rycroft. 1990. Cycloarthane derivatives from *Garcinia lucida*. *Phytochem.*, 29: 994-997.
120. O.M.S, 2002. Organisation Mondiale de la Santé (O.M.S) Rapport sur la médecine traditionnelle : Besoins et potentiel. N° 4. 6 p
121. Okeke, I.N., Lamikanra, A, & R. Edelman. 1999. Socio-economic and behavioral factors leading to acquired bacterial resistance to antibiotics in developing countries. *Emerg Infect Dis.* 5:18-27.
122. Pai, H., Lyu, S., Lee, J. H., Kim, J., Kwon, Y., Kim, J.-W., & K. W. Choe. 1999. Survey of extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: prevalence of TEM-52 in Korea. *J. Clin. Microbiol.* 37:1758–1763.
123. Paterson, D.L. & R.A. Bonomo. 2005. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clinic. Microbiol. Rev.*, 18: 657-686.
124. Pegel, K.H., CB. Rogers. 1968. Constituents of *Bridelia micrantha*. *Phytochem.*, 7: 655-656.

125. Pepperell, C., Kus, J. V., Gardam, M. A., Humar, A., & L. L. Burrows. 2002. Low-virulence *Citrobacter* species encode resistance to multiple antimicrobials. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 3555-3560.
126. Perilli, M., Dell'Amico, E., Segatore, B., de Massis, M. R., Bianchi, C., Luzzaro, F., Rossolini, G. M., Toniolo, A., Nicolletti, G. & G. Amicosante. 2002. Molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamases produced by nosocomial isolates of *Enterobacteriaceae* from an Italian nationwide survey. *J. Clin. Microbiol.* 40: 611-614.
127. Pfaller, M.A., Jones, R.N., Doern, G.V. & K. Kugler. 1998. Bacterial pathogens isolated from patients with blood stream infection: frequencies of occurrence and antimicrobial susceptibility patterns from the SENTRY antimicrobial surveillance program (United States and Canada, 1997). *Antimicrob Agents Chemother.*, 42:1762-1770.
128. Philippon, A., Labia, R. & J. A. Jacoby. 1989. Extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33 : 1131-1136.
129. Philippon, A, Arlet, G. & Lagrange, PH. 1994. Origin and impact of plasmid-mediated extended-spectrum β -lactamases. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*13:S1-S13.
130. Philippon, A. M., Paul, G. A., & G. A. Jacoby. 1983. Properties of PSE-2 β -lactamase and genetic basis for its production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 24:362–369.
131. Philippon, A., Arlet G. & P. H. Lagrange. 1993. β -lactamses à Spectre élargi. *Rev. Prat.* 43 : 2387-2395.
132. Philippon, A., Arlet, G. & G.A. Jacoby. 2002. Plasmid-determined AmpC-type β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 46: 1-11.
133. Philippon, A., Arlet, G. & P. H. Lagrange. 1995. Origin and impact of plasmid-mediated extended spectrum beta-lactamases. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 13 : 17-29.
134. Phillips, O. A. D. P Czajkowslü, P. Spevac, M. P. Singh, C. Hanehara-Knnugita, A. Hyodo, R Micetich , G. & S. N. Maiti. 1997. SYN-1012: A new β -lactamase inhibitor of penem skeleton. *J. Antibiot. Tokyo* 50:350-356.

135. Pitout, J. D. D., Thomson, K. S., Hanson, N. D., Ehrhardt, A. F., Coudron, P., & C.C. Sanders. 1998. Plasmid mediated resistance to expanded-spectrum cephalosporins among *Enterobacter aerogenes* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42 : 596-600.
136. Pitout, J.D.D., Reisbig, M.D., Venter E.C., Church, D.L. & N.D. Hanson. 2003. Modification of the Double-disk test for detection of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum and AmpC β -lactamases. *J. Clin. Microbiol.*, 41: 3933-3935.
137. Pitout, J.D.D., Thomson, K. S., Hanson, N.D., Ehrhardt, A.F., Moland, E.S., & C.C. Sanders. 1998. β -Lactamases Responsible for Resistance to Expanded-Spectrum Cephalosporins in *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis* Isolates Recovered in South Africa. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 42: 1350-1354.
138. Poiret, L., Naas, T., Le Thomas, I., Karim, A., Bingen, E., & P. Nordman. 2001. CTX-M-type extended-spectrum β -lactamase that hydrolyses ceftazidime through a single amino acid substitution in the Omega loop. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:3355-3361.
139. Poirel, L. and P Nordmann. 2005. Nomenclature of GES-type extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 49: 2148-2150.
140. Poirel, L., Weldhagen, G. F., De Champs, C., & P. Nordmann. 2002. A nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* isolates expressing the extended-spectrum beta-lactamase GES-2 in South Africa. *J. Antimicrob. Chemother.* 49 : 561–565.
141. Poirel, L., Decousser J.-W., & P. Nordmann. 2003. Insertion sequence *ISEcpIB* is involved in expression and mobilization of a *bla*CTX-M β -lactamase gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:2938–2945.
142. Randegger, C. C., Keller, A., Irla, M., Wada, A.&H. Hächler. 2000. Contribution of natural amino acid substitutions in SHV extended-spectrum β -lactamases to resistance against various β -lactams. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 2759-2763.
143. Richard, C., Philippon, A., M'Boup, S. & J. F. Vieu. 1989. Epidémiologie des infections pédiatriques a *Klebsiella* dans deux hopitaux de Dakar. Production de β -lactamases à spectre élargi (1987–1988). *Med. Mal. Infect.* 19: 753–759.
144. Rolinson, G. N. 1991. Evolution of β -lactamase inhibitors. *Rev. Inf. Dis.* 13:S727-732.

145. Saiki, R. K., Scharf, S. J., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich H. A. & N. Arnheim. 1985. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for the diagnosis of sickle-cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.
146. Sambrook, J., Fritsch, E. F., & T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
147. Samie, A., Obi, C.L., Bessong, P.O., Namrita, L. 2005. Activity profiles of fourteen selected medicinal plants from Rural Venda communities in South Africa against fifteen clinical bacterial species. *African J. Biotechno.* 4: 1443-1451
148. Sanders, C. C. 1992. β -lactamases of Gram-negative bacteria: New challenges for new drugs. *Clin. Infect. Dis.* 14 : 1098-1099.
149. Sanders, C. C. & W. E. Jr Sanders. 1992. β -lactam resistance in gram negative bacteria : global trends and clinical impact. *Clin. Infect. Dis.* 15 : 824-839.
150. Sanders, C. C., Barry, A. L., Washington, J. A., Shubert, C., Moland, E. S., Traczewski, M. M., Knapp, C. & R. Mulder. 1996. Detection of extended-spectrum-beta-lactamase-producing members of the family *Enterobacteriaceae* with Vitek ESBL test. *J. Clin. Microbiol.* 34:2997–3001.
151. Scheifer, K.H., & O. Kandler. 1972. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol Rev* 36 : 407-477
152. Seid, J. & D. Asrat. 2005. Occurrence of extended spectrum beta-lactamase enzymes in clinical isolates of Klebsiella species from Harar region, eastern Ethiopia. *Acta Trop.* 95: 143-148.
153. She, D., and Y. Liu. 2002. The expression of AmpC and extended-spectrum beta-lactamases among clinical isolates of *Enterobacter cloacae* and its impact on antibiotics susceptibility. *Chin. Med. J.* 82:1355–1358.
154. Sirot, D. 1995. Extended-spectrum plasmid-mediated beta-lactamases. *J. Antimicrob. Chemother.* 36 (suppl. A) : 19-34.
155. Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by Agarose gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98:503-517.
156. Spratt, B.G. & A.B Pardee. 1975. Penicillin-binding proteins and cell-shape in *Escherichia coli*. *Nature*, 254 : 516-517.
157. Stapleton, P. D., Shannon, K. P. & G. L. French. 1999. Construction and characterization of mutants of the TEM-1 β -lactamase containing amino acid

- substitutions associated with both extended-spectrum resistance and resistance to β -lactamase inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 1881-1887.
158. Tenover, F. C., Mohammed, M. J., Gorton, T. S., & Z. F. Dembek. 1999. Detection and reporting of organisms producing extended-spectrum betalactamases: survey of laboratories in Connecticut. *J. Clin. Microbiol.* 37: 4065–4070
159. Therrien C. 1998. Etude structure-fonction de la β -lactabiasePSE-4 : inhibition enzymatique et spécificité de substrat. Thèse Ph.D. Université de Lavazl, Laval, Canada. 118 p.
160. Thomson, K. S. & C. C. Sanders. 1992. Detection of extended-spectrum β -lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae* : comparison of the double-disk and three-dimensional tests. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36 : 1877-1882.
161. Thomson, K. S. 1995. Improved detection of extended-spectrum β -lactamases from disk diffusion susceptibility test (Abst. C-87). The general meeting of the American Society for Microbiology. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
162. Toney, J.H., Hammond, G.G., Fitzgerald, P.M.D., Sharma, N., Balkovec, J.M., Rouen, G.P., Olson, S.H., Hammond, M.L., Greenlee, M.L., &Y.-D. Gao. 2001. Succinic Acids as Potent Inhibitors of Plasmid-borne IMP-1 Metallo- β -lactamase. *J Biol. Chem .*, 276: 31913-31918.
163. Tzouveleakis, L., Tzelepi, E., Tassios, P. T. & N. J. Legakis. 2000. CTX-M-type β -lactamases: an emerging group of extended-spectrum enzymes. *Inter. J. Antimicrob. Agents* 14: 137-142.
164. Van Hoof, P.A.M. 2001. Molecular modelling studies with regard to the observed resistance profile of *Streptococcus pneumoniae* PBP2X resulting from some naturally occurring active site mutations.Ph.D. Thesis, Heinrich-Hein-Universität Dusseldorf, Dusseldorf (Germany), 238 p.
165. Vanhove, M., Raquet, X. & J.M. Frère. 1995. Investigation of the folding pathway of the TEM-1 β -lactamase. *Proteins: Structure, Function, and Genetics. Proteins*, 22: 110-118.
166. Venezia, R. A., Scarano, F. J., Preston, K. E., Steele, L. M., Root, T.P., Limberger, R., Archinal, W. & M.A. Kacica. 1995. Molecular epidemiology of an SHV-5 extended-spectrum beta-lactamase in *Enterobacteriaceae* isolated from infants in a neonatal intensive care unit. *Clin. Infect. Dis.* 21: 915-923

167. Vercauteren, E., P. Descheemaeker, M. Leven, C. C. Sanders, & H. Goossens. 1997. Comparison of screening methods for the detection of extended-spectrum β -lactamases and their prevalence among blood isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in a Belgian teaching hospital. *J. Clin. Microbiol.*, 35:2191–2197.
168. Versalovic, J., T. Koeuth, and J.R., Lupski. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acid Res.* 19: 6823-6831.
169. Walsh, C. 2003. Antibiotics : actions, origins, resistance. Washington, D.C., ASM Press.
170. Walsh, T. R., Toleman, M. A., Poirel, L., & P. Nordmann. 2005. Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm? *Clin. Microbiol. Rev.* 18:306–325.
171. Weill, F. X., M. Demartin, D. Tandé, E. Espié, I. Rakotoarivony & P. D. A. Grimont. 2004. SHV-12-like extended-spectrum- β -lactamase-producing strains of 19 *Salmonella enterica* serotypes Babelsberg and Enteridis isolated in France among infants adopted from Mali. *J. Clin. Microbiol.* 42: 2432-2437.
172. Weiss, W. J., Petersen, P.J., Murphy, T.M., Tardio, L.A., Yang, Y., Bradford, P.A., Venkatesan., A.M., Abe, T., Isoda, T., Projan, S., O’Connell, J. & T.S. Mansour. 2004. In Vitro and In Vivo Activities of Novel 6-Methylidene Penems as β -Lactamase Inhibitors. 2004. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 48 : 4589-459648.
173. Winokur, P. L., Canton, R., Casellas, J. M. & N Legakis. 2001. Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum β -lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific region. *Clin. Infect. Dis.* 32(suppl. 2): S94-S103.
174. Witte, W. 1997. Impact of antibiotic use in animal feeding on resistance of bacterial pathogens in humans. *Ciba Found Symp* 207: 61-71; discussion 71-5.
175. Wong-Beringer, A., Hindler, J., Loeloff, M., Queena, A. M., Lee, N., Pegues, D. A., Quinn, J. P., and K. Bush. 2002. Molecular correlation for the treatment outcomes in bloodstream infections caused by *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* with reduced susceptibility to ceftazidime. *Clin. Infect. Dis.* 34: 135-146.
176. Xiong, Z., Zhu, D., Wang, F., Zhang, Okamoto, Y. R. & A. Inoue. 2002. Investigation of extended-spectrum β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* from China. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 44: 195-200.

177. Yagi, T., Kruokawa, H., Shibata, N., Shibayama, K., & Y. Arakawa. 2000. A preliminary survey of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Japan. *FEMS Microbiol. Lett.*, 184:53–56.
178. Yan, J.-J., Wu, S.-M., Tsai, S.-H., Wu, J.-J. & I.-J. Su. 2000. Prevalence of SHV-12 among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamases and identification of a novel AmpC enzyme (CMY-8) in southern Taiwan. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:1438–1442.
179. Yang, Y., Bhachech, N., Bradford, P. A., Jett, B. D., Sahm, D. F. & K. Bush. 1998. Ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates producing TEM-10 and TEM-43 beta-lactamases from St. Louis, Missouri. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:1671–1676.
180. Yu, L. W., Wu, L. T., Pfaller, M. A., Winokur, P. L. & R. N. Jones. 2003. Emergence of two *Klebsiella* Isolates harboring plasmid-mediated CTX-M-15 β -lactamase in Tawan. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48: 362-363.

ANNEXE

ANNEXE**ANNEXE A****Listes des publications**

1. Gangoué-Piéboji, J., Koulla-Shiro, S., Ngassam, P., Adio ; D., Njine, T. & P. Ndumbe. 2004. Antimicrobial resistance of Gram-negative bacilli isolates from inpatients and outpatients at Yaoundé Central Hospital, Cameroon. *Inter. J. Infect. Dis.* 8: 147-154.
2. Gangoué-Piéboji, J., Miriagou, V., Vourli, E., Tzelepi, E., Ngassam, P. & L.S. Tzouvelekis. 2005. Emergence of CTX-M-15-producing Enterobacteria in Cameroon and characterization of *bla*_{CTX-M-15}-carrying element. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49 : 441-443.
3. Gangoué-Piéboji, J., Bedenic, B., Koulla-Shiro, S., Randegger, C., Adio, D., Ngassam, P., Numbe, P., & H. Hächler. 2005. Extended-spectrum- β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in Yaounde, Cameroon. *J. Clin. Microb.* 43 : 3273-3277.
4. Gangoué-Piéboji, J., Pegnyemb, D.E., Niyitegeka, D., Nsangou, A., Eze, N., Minyem, C., Ngo Mbing, J., Ngassam, P., Ghogomu Tih, R., Sodengam, B.L. & B. Bodo. 2006. In vitro antimicrobial activity of some medicinal plants from Cameroon. *Ann. Trop. Med. Parasito.* 100: 237-243
5. Gangoué-Piéboji, J., Koulla-Shiro, S., Ngassam, P., Adio, D., P.M. Ndumbe. 2006. In vitro activity of antimicrobial agents against 505 Gram negative bacilli isolated from Yaoundé Central Hospital laboratory of Bacteriology. *African Health Sciences.* 6: 232-235
6. Gangoué-Piéboji, J., Baurin, S., Frère, J. M., Ngassam P., Ngameni, B., Azebaze, A., Pegnyemb, D., Watchuen, J., Goffin, C., Galleni, M. 2007. Screening of some medicinal plants from Cameroon for β -lactamase inhibitor activity. *Phytother. Res.* 21: 284-287

ANNEXE B

Tableau 15 : Schémas de classification des β -lactamases des bactéries

Bush-Jacoby-Medeiros group	1989 Bush group (44)	Richmond-Sykes class (253)	Mitsubishi-Inoue type (194) ^a	Molecular class (2, 121, 132)	Preferred substrates	Inhibited by:		Representative enzymes
						CA ^b	EDTA	
1	1	Ia, Ib, Id	CSase	C	Cephalosporins	–	–	AmpC enzymes from gram-negative bacteria; MIR-1
2a	2a	Not included	PCase V	A	Penicillins	+	–	Penicillinases from gram-positive bacteria
2b	2b	III	PCase I	A	Penicillins, cephalosporins	+	–	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	2b'	Not included except K1 in class IV	CXase	A	Penicillins, narrow-spectrum and extended-spectrum cephalosporins, monobactams	+	–	TEM-3 to TEM-26, SHV-2 to SHV-6, <i>Klebsiella oxytoca</i> K1
2br	Not included	Not included	Not included	A	Penicillins	±	–	TEM-30 to TEM-36, TRC-1
2c	2c	II, V	PCase IV	A	Penicillins, carbenicillin	+	–	PSE-1, PSE-3, PSE-4
2d	2d	V	PCase II, PCase III	D	Penicillins, cloxacillin	±	–	OXA-1 to OXA-11, PSE-2 (OXA-10)
2e	2e	Ic	CXase	A	Cephalosporins	+	–	Inducible cephalosporinases from <i>Proteus vulgaris</i>
2f	Not included	Not included	Not included	A	Penicillins, cephalosporins, carbapenems	+	–	NMC-A from <i>Enterobacter cloacae</i> , Sme-1 from <i>Serratia marcescens</i>
3	3	Not included	Not included	B	Most β -lactams, including carbapenems	–	+	L1 from <i>Xanthomonas maltophilia</i> , CcrA from <i>Bacteroides fragilis</i>
4	4	Not included	Not included	ND ^c	Penicillins	–	?	Penicillinase from <i>Pseudomonas cepacia</i>

^a Csase, cephalosporinase; PCase, penicillinase; CXase, cefuroxime-hydrolyzing β -lactamase.

^b CA, clavulanic acid.

^c ND, not determined.

ANNEXE C

```

SHV-1Bra: 4  ttatgCGTTATATTGcCctGtGtattatctccctgTtagccaccctgCCgctggCGgtac 63
      |||
SHV-12Ca: 72  ttatgCGTTATATTGcCctGtGtattatctccctgTtagccaccctgCCgctggCGgtac 131
      |||
SHV-1Bra: 64  acgCCagccCGcagccGcttgagcaaatTaaactaagCGaaagccagctGtcgggCCgCG 123
      |||
SHV-12Ca: 132 acgCCagccCGcagccGcttgagcaaatTaaacaaagCGaaagccagctGtcgggCCgCG 191
      |||
SHV-1Bra: 124 taggcatgatagaaatggatctggccagCGgCCgCACgctgaccGCctggCGCGccgatG 183
      |||
SHV-12Ca: 192 taggcatgatagaaatggatctggccagCGgCCgCACgctgaccGCctggCGCGccgatG 251
      |||
SHV-1Bra: 184 aacGctttcccatgatgagcacctTtaaagtagtGctctgCGgCGcagtgctggCGCGgg 243
      |||
SHV-12Ca: 252 aacGctttcccatgatgagcacctTtaaagtagtGctctgCGgCGcagtgctggCGCGgg 311
      |||
SHV-1Bra: 244 tggatgCCggtgacgaacagctggagCGaaagatccactatCGccagcaggatctGGtgg 303
      |||
SHV-12Ca: 312 tggatgCCggtgacgaacagctggagCGaaagatccactatCGccagcaggatctGGtgg 371
      |||
SHV-1Bra: 304 actactCGcCGgtcagCGaaaaacacctTgCCgacCGcatgacGGtCGgCGaaactctGCG 363
      |||
SHV-12Ca: 372 actactCGcCGgtcagCGaaaaacacctTgCCgacCGcatgacGGtCGgCGaaactctGCG 431
      |||
SHV-1Bra: 364 cCGcCGccattaccatgagCGataacagCGcCGccaatctGctactggCCaccGtCGgCG 423
      |||
SHV-12Ca: 432 cCGcCGccattaccatgagCGataacagCGcCGccaatctGctgctggCCaccGtCGgCG 491
      |||
SHV-1Bra: 424 gccccgCaggattgactGcctttttgCGccagatCGgCGacaacGtCACCCgCcttgacc 483
      |||
SHV-12Ca: 492 gccccgCaggattgactGcctttttgCGccagatCGgCGacaacGtCACCCgCcttgacc 551
      |||
SHV-1Bra: 484 gctgggaaacGgaactgaatgagGCGcttCCCGCGacGcCCCGcGacaccactacCCCGg 543
      |||
SHV-12Ca: 552 gctgggaaacGgaactgaatgagGCGcttCCCGCGacGcCCCGcGacaccactacCCCGg 611
      |||
SHV-1Bra: 544 ccagcatggCCgCGaccctGCGcaagctGctgaccagCCagCGtctgagCGcCCGttCGc 603
      |||
SHV-12Ca: 612 ccagcatggCCgCGaccctGCGcaagctGctgaccagCCagCGtctgagCGcCCGttCGc 671
      |||
SHV-1Bra: 604 aacGGcagctGctGcagtgGatggTggacGatCGggTcGcCGgaccGttgatCCGtCCg 663
      |||
SHV-12Ca: 672 aacGGcagctGctGcagtgGatggTggacGatCGggTcGcCGgaccGttgatCCGtCCg 731
      |||
SHV-1Bra: 664 tGctgCCgCGggGctGgtttatCGCCgataagacCGgagctggcGagCGggGtGCGCGCG 723
      |||
SHV-12Ca: 732 tGctgCCgCGggGctGgtttatCGCCgataagacCGgagctagcaagCGggGtGCGCGCG 791
      |||
SHV-1Bra: 724 ggattgtCGccctGctTggCCCGaataaCaagcagagCGcattgtGgtgatttatctGc 783
      |||
SHV-12Ca: 792 ggattgtCGccctGctTggCCCGaataaCaagcagagCGcattgtGgtgatttatctGc 851
      |||
SHV-1Bra: 784 gggatacccggCGagcatggCCgagCGaaatcagCaaatCGcCGgGatCGgCGCGgCGc 843
      |||
SHV-12Ca: 852 gggatacgccggCGagcatggCCgagCGaaatcagCaaatCGcCGgGatCGgCGCGgCGc 911
      |||
SHV-1Bra: 844 tgatCGagcactGGcaacGctaa 866
      |||
SHV-12Ca: 912 tgatCGagcactGGcaacGctaa 934

```

Figure 28 : Comparaison des séquences nucléotidiques de *bla_{SHV-1}* de Bradford (2001) (SHV-1Bra) et *bla_{SHV-12}* du Cameroun (SHV-12Ca). (5 différences aux positions : 166, 476, 774, 777 et 860)

ANNEXE D

```

SHV-12Ca: 1 aacgcccgggttattcttattttgtcgcttctttactcgcctttatcggccttcactcaagg 60
|||
SHV-12Or: 1 aacgcccgggttattcttattttgtcgcttctttactcgcctttatcggccttcactcaagg 60
SHV-12Ca: 61 atgtattgtgggttatgcggttatattcgctgtgtattatctccctgtagccaccctgcc 120
|||
SHV-12Or: 61 atgtattgtgggttatgcggttatattcgctgtgtattatctccctgtagccaccctgcc 120
SHV-12Ca: 121 gctggcgggtacacgccagcccgagccgcttgagcaaattaacaaaagcgaagccagct 180
|||
SHV-12Or: 121 gctggcgggtacacgccagcccgagccgcttgagcaaattaacaaaagcgaagccagct 180
SHV-12Ca: 181 gtcgggcccgcgtaggcatgatagaaatggatctggccagcggccgcacgctgaccgcctg 240
|||
SHV-12Or: 181 gtcgggcccgcgtaggcatgatagaaatggatctggccagcggccgcacgctgaccgcctg 240
SHV-12Ca: 241 gcgcgccgatgaacgctttcccatgatgagcacctttaagtagtgctctgcggcgcagt 300
|||
SHV-12Or: 241 gcgcgccgatgaacgctttcccatgatgagcacctttaagtagtgctctgcggcgcagt 300
SHV-12Ca: 301 gctggcgcgggtggatgcccgggtgacgaacagctggagcgaagatccactatcgccagca 360
|||
SHV-12Or: 301 gctggcgcgggtggatgcccgggtgacgaacagctggagcgaagatccactatcgccagca 360
SHV-12Ca: 361 ggatctggtggactactcgccgggtcagcgaaaaacaccttgccgacggcatgacggtcgg 420
|||
SHV-12Or: 361 ggatctggtggactactcgccgggtcagcgaaaaacaccttgccgacggcatgacggtcgg 420
SHV-12Ca: 421 cgaactctgcccgcgcgcattaccatgagcgcataacagcgcgcgccaatctgctgctggc 480
|||
SHV-12Or: 421 cgaactctgcccgcgcgcattaccatgagcgcataacagcgcgcgccaatctgctgctggc 480
SHV-12Ca: 481 caccgctcggcggccccgcaggattgactgcctttttgcccagatcggcgcacaacgctcac 540
|||
SHV-12Or: 481 caccgctcggcggccccgcaggattgactgcctttttgcccagatcggcgcacaacgctcac 540
SHV-12Ca: 541 ccgccttgaccgctgggaaacggaactgaatgagggcgttcccggcgacgcccgcgacac 600
|||
SHV-12Or: 541 ccgccttgaccgctgggaaacggaactgaatgagggcgttcccggcgacgcccgcgacac 600
SHV-12Ca: 601 cactaccccgccagcatggccgcgaccctgcgcaagctgctgaccagccagcgtctgag 660
|||
SHV-12Or: 601 cactaccccgccagcatggccgcgaccctgcgcaagctgctgaccagccagcgtctgag 660
SHV-12Ca: 661 cgcccgttcgcaacggcagctgctgcagtggtggacgatcgggtcgccggaccggt 720
|||
SHV-12Or: 661 cgcccgttcgcaacggcagctgctgcagtggtggacgatcgggtcgccggaccggt 720
SHV-12Ca: 721 gatccgctccgtgctgcccggcgggctggtttatcgccgataagaccggagctagcaagcg 780
|||
SHV-12Or: 721 gatccgctccgtgctgcccggcgggctggtttatcgccgataagaccggagctagcaagcg 780
SHV-12Ca: 781 ggggtgcgcgcgggattgtcgccctgcttggcccgaataacaaaagcagagcgcattgtggt 840
|||
SHV-12Or: 781 ggggtgcgcgcgggattgtcgccctgcttggcccgaataacaaaagcagagcgcattgtggt 840
SHV-12Ca: 841 gatttatctgcgggatacgcggcgagcatggccgagcgaatcagcaaatcgccgggat 900
|||
SHV-12Or: 841 gatttatctgcgggatacgcggcgagcatggccgagcgaatcagcaaatcgccgggat 900
SHV-12Ca: 901 cggcgcggcgctgatcgagcactggcaacgctaaccggcggtggccgcgcgcttatcc 960
|||
SHV-12Or: 901 cggcgcggcgctgatcgagcactggcaacgctaaccggcggtggccgcgcgcttatcc 960
SHV-12Ca: 961 ggcccgcagcacctcgcagcgtgccggcgatatagactggcggcgcatcgaaaga 1018
|||
SHV-12Or: 961 ggcccgcagcacctcgcagcgtgccggcgatatagactggcggcgcatcgaaaga 1018

```

Figure 29 : Comparaison des séquences nucléotidiques de *bla_{SHV-12}* du Cameroun (SHV-12Ca) et *bla_{SHV-12}* original (SHV-12Or). (Une seule différence après de codon stop taa à la position 935)