

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université ABOUBEKR BELKAÏD – Tlemcen



**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie,
Des Sciences de la Terre et de l'Univers**

Département de Biologie

*Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire,
Au Biomédical et à l'Environnement*

Laboratoire de Produits Naturels

Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Master en Biologie

Option : Microbiologie

*Etude de l'activité antibactérienne des extraits de **Berberis vulgaris (L.)** et **Punica granatum (L.)** vis – à – vis de souches bactériennes multirésistantes aux antibiotiques isolées du C.H.U de Tlemcen*

Présenté par :

BELLAÏDI El- Batoul

Soutenu le .. / .. / 2012 devant le jury :

Mme HASSAINE H.

Maître de Conférences

Présidente

Mr RAHMOUN N.

Maître Assistant

Examineur

Mr SENOUCI BEREKSI M.

Maître Assistant

Promoteur

nnée Universitaire : 2011 - 2012

Remerciements

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude, ma reconnaissance et mes vifs remerciements à Monsieur SENOUCI BEREKSI Mohamed, Maître Assistant, Chargé de cours au Département de Biologie, Faculté des SNV-STU, Université Aboubekr Belkaïd de Tlemcen, pour avoir fait l'honneur d'accepter la direction de ce mémoire, je le remercie pour l'aide, les conseils et les encouragements qu'il n'a cessé de prodiguer tout au long de ce travail.

Je tiens à exprimer mes vifs remerciements à Madame HASSAINE H. Maître de conférences au Département de Biologie, Faculté des SNV-STU, Université Aboubekr Belkaïd de Tlemcen, pour avoir fait l'honneur de présider ce jury.

Je tiens à remercier chaleureusement Monsieur RAHMOUN N., Maître Assistant au Département de Biologie, Faculté des SNV-STU, Université Aboubekr Belkaïd de Tlemcen, pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Dédicaces

Je dédie ce travail à mes parents,
qu'ils trouvent ici toute ma gratitude
pour leur soutien tout au long de mes études

A mes frères et mes sœurs

A mes cousins et cousines

A toute ma famille paternelle et maternelle

A tous mes collègues et amis(es).

Liste de figures

Figure 1 : Photo de <i>Berberis vulgaris</i>	6
Figure 2 : Photo de <i>Punica granatum</i>	8
Figure 3. Classification des antibiotiques selon leurs sites d'action	11
Figure 4. Cycle lactame	11
Figure 5. Principales structures des β -lactamines	13
Figure 6 : Acylation du site actif d'une protéine de liaison à la pénicilline (PLP) par une β - lactamine	14
Figure 7: Représentation des mécanismes de résistance aux antibiotiques	15

Liste de tableaux

Tableau 1 : Classe majeure de composés antimicrobiens des plantes et mécanisme d'action	5
Tableau 2 : Principales bactéries multirésistantes trouvées en milieu hospitalier	17
Tableau 3 : Souches bactériennes utilisées	20
Tableau 4: Rendements en extraits secs des deux plantes étudiées	24
Tableau 5 : Moyenne des diamètres des zones d'inhibition (mm) des extraits de <i>Berberis vulgaris</i> et <i>Punica granatum</i>	25
Tableau 6 : Concentration minimale inhibitrice de l'extrait des écorces de <i>Punica granatum</i>	27

Liste des abréviations

ADN : Adénosine désoxyribonucléique.

ATCC : American Type Culture Collection

C.CLIN : Centre de Coordination de la Lutte contre les Infections Nosocomiales.

CHU : Centre Hospitalo- Universitaire

°C : Degrés Celsius

C.M.I. : Concentration Minimale Inhibitrice

DO : Densité optique

ERV : Entérocoques résistants à vancomycine.

HIV : Human Immunodeficiency Virus (virus du SIDA).

mm : millimètre

µg : microgramme

mg : milligramme

ml : millilitre

nm : nanomètre

OMS : Organisation Mondiale de la Santé.

PLPs : Protéines Liant la Pénicilline.

PBPs : Penicillin-Binding Proteins .

PLP : protéine de liaison à la pénicilline.

RHV : Résistance hétérogène à la vancomycine.

SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline.

SARV : *Staphylococcus aureus* résistant à la vancomycine.

Sommaire

Introduction

Introduction	1
--------------------	---

Synthèse bibliographique

1. La Phytothérapie	3
1.1. Définition	3
1.2. Les avantages de la phytothérapie.....	3
2. Les plantes médicinales.....	4
2.1. Définition	4
2.2. Le pouvoir des plantes médicinales.....	4
2.3. Efficacité des plantes entières.....	6
3. Les plantes médicinales sélectionnées	6
3.1. <i>Berberis vulgaris</i> (Berberidaceae).....	6
3.1.1. Description botanique	6
3.1.2. Classification	7
3.1.3. Habitat et culture	7
3.1.4. Effets et usages médicinaux	7
3.2. <i>Punica granatum</i> (Punicaceae)	8
3.2.1. Description botanique :.....	8
3.2.2. Classification.....	9
3.2.3. Propriétés pharmacologiques et thérapeutiques.....	9
3.2.4. Origine géographique	9
4. Les infections nosocomiales	10
5. Les Antibiotiques	10
5.1. Les Bêta- lactamines	11
5.1.1. Classification	11
5.1.2. Mécanisme d'action	13
5.2. Résistance aux antibiotiques	14

Matériel et Méthodes	18
1. Matériel végétal	19
2. Préparation des extraits bruts méthanoliques	19
3. Etude de l'activité antibactérienne des extraits des deux plantes	19
3.1. Souches bactériennes testées	19
3.2. Les milieux de cultures utilisés	20
3.3. Préparation de l'inoculum	20
3.4. Méthode de diffusion des disques sur milieu solide	21
3.5. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice en milieu liquide	21
Résultats et Discussion	23
1. Calcul des rendements	24
2. Etude de l'activité antibactérienne des extraits étudiés	25
3. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice en milieu liquide	26
Conclusion générale	29
<i>Références bibliographiques</i>	31
<i>Annexe</i>	39

Introduction

L'utilisation abusive et systématique des antibiotiques a été appliquée dans des syndromes infectieux mineurs, durant des périodes trop courtes, à des doses souvent mal adaptées. Toutes ces fausses manœuvres ont entraîné la création de nouvelles races de germes, résistants à de nombreux antibiotiques (**Belaïche, 1979**).

L'utilisation des plantes en thérapeutique (phytothérapie) est très ancienne et connaît actuellement un regain d'intérêt auprès du public. Il est possible d'utiliser les plantes entières ou les produits d'extraction qu'elles fournissent. (**Marc, 2001**).

Aujourd'hui, et malgré les progrès réalisés en médecine, plusieurs populations ont recours aux plantes pour se soigner, soit par inaccessibilité aux médicaments prescrits par la médecine moderne, soit parce que ces plantes ont donné des résultats thérapeutiques très encourageants et à moindre effets secondaires remarqués lors de leur utilisation, soit parce qu'elles sont moins agressives et moins nocives pour l'organisme (**Arrif et Benkhaled, 2009**).

La recherche de nouvelles molécules pharmacologiques actives via le screening de sources naturelles a permis la découverte d'un grand nombre de médicaments utiles qui commencent à jouer un rôle majeur dans le traitement de nombreuses maladies humaines (**Gurib-Fakim, 2006**).

Notre étude a pour but :

- L'isolement et l'identification de souches d'entérobactéries au niveau de différents services du CHU de Tlemcen, et étude de leur état d'antibiorésistance.
- La préparation des extraits bruts à partir de plantes médicinales sélectionnées,
Berberis vulgaris (L.) et *Punica granatum* (L.).
- L'étude de l'activité antibactérienne de ces extraits de plantes.
- Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI).

Synthèse
Bibliographique

1. La Phytothérapie :

Sur tous les continents, depuis que l'homme existe, le règne végétal a servi, pour guérir les maladies, les botanistes, les médecins et les chimistes. Ces connaissances plus qu'ancestrales se sont transmises de génération en génération et la médecine moderne s'appuie encore très souvent sur ce savoir pour initier de nouveaux remèdes médicamenteux (**Baudoux, 2001**).

Aujourd'hui les principes actifs des plantes sont des composants essentiels d'une grande partie de nos médicaments et produits de soins (**Hans, 2007**). Malgré les multiples progrès de la médecine moderne, il y a un net regain d'intérêt vis-à-vis de la phytothérapie. Selon l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) plus de 80% de la population mondiale ont recours à la pharmacopée traditionnelle pour faire face aux problèmes de la santé (**Farnsworth et al., 1986**).

En effet, sur les 300 000 espèces végétales recensées sur la planète, plus de 200 000 espèces vivent dans les pays tropicaux d'Afrique ont des vertus médicinales (**Millogo et al., 2005**).

A l'image des autres pays du Maghreb, de l'Afrique et du Tiers monde, l'emploi empirique des plantes médicinales continue de garder une grande popularité en Algérie. Bien souvent dans certaines régions rurales, il est difficile de savoir si l'herboriste aux plantes « miraculeuse » n'est pas préféré au médecin moderne (**Benmerabet et Abed, 1982 ; Boulos, 1983**).

1.1. Définition :

La phytothérapie - du grec *phytos*, la plante - est un néologisme probablement inventé par Henri Leclerc au début du siècle. Le terme est désormais largement utilisé pour désigner l'utilisation à des fins thérapeutiques des plantes médicinales (**Belaïche, 1983**).

1.2. Les avantages de la phytothérapie :

Malgré les énormes progrès réalisés par la médecine moderne, la phytothérapie offre de multiples avantages. N'oublions pas que de tout temps à l'exception de ces cent dernières années, les hommes n'ont pas eu que les plantes pour se soigner, qu'il s'agisse de maladies bénignes, rhume ou toux ou plus sérieuses, telles que la tuberculose ou la malaria (**Iserin et al., 2001**).

Aujourd'hui, les traitements à base des plantes reviennent au premier plan, car l'efficacité des médicaments tels que les antibiotiques (considérés comme la solution quasi universelle aux infections graves) décroît, les bactéries et les virus se sont peu à peu adaptés aux médicaments et leur résistent de plus en plus.

La phytothérapie qui repose sur des remèdes naturels est bien acceptée par l'organisme, et souvent associée aux traitements classiques. Elle connaît de nos jours un renouveau exceptionnel en occident, spécialement dans le traitement des maladies chroniques comme l'asthme ou l'arthrite (**Iserin et al., 2001**).

2. Les plantes médicinales :

2.1. Définition :

La définition d'une plante médicinale est très simple. Il s'agit d'une plante qui est utilisée pour prévenir, soigner ou soulager divers maux. Les plantes médicinales sont des drogues végétales dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses (**Farnsworth et al., 1986**).

2.2. Le pouvoir des plantes médicinales :

L'action de la phytothérapie sur l'organisme dépend de la composition des plantes, depuis XVIII^{ème} siècle, au cours duquel des savants ont commencé à extraire et à isoler les substances chimiques qu'elles contiennent. On considère les plantes et leurs effets en fonction de leurs principes actifs. La recherche des principes actifs d'extraits des plantes est d'une importance capitale car elle a permis la mise au point de médicaments essentiels (**Iserin et al., 2001**).

Les substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie, en alimentation, en cosmétologie et en pharmacie. Parmi ces composés on retrouve dans une grande mesure les métabolites secondaires qui se sont surtout illustrés en thérapeutique. La pharmacie utilise encore une forte proportion de médicaments d'origine végétale et la recherche trouve chez les plantes des molécules actives nouvelles, ou des matières premières pour la semi synthèse (**Bahorun, 1997**).

Les propriétés antimicrobiennes des plantes aromatiques et médicinales sont connues depuis l'antiquité. Toutefois, il aura fallu attendre le début du 20^{ème} siècle pour que les scientifiques commencent à s'y intéresser (**Yano et al., 2006**).

L'étude des principes actifs de ces nouveaux agents antimicrobiens offre un grand avantage pour l'antibiothérapie qui, dans sa bataille contre les microbes pathogènes, doit disposer de nouvelles molécules biologiques pour lutter contre le phénomène d'apparition des résistances à l'usage fréquent des antibiotiques (**Penge, 1992 ; Nacoulma, 1996**).

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 1) (**Cowan, 1999**).

Tableau 1 : Classe majeure de composés antimicrobiens des plantes et mécanisme d'action (**Cowan, 1999**).

Classes	Sous classe	Exemples	Mécanisme d'action
Phénols	Phénols simples	Catéchol	Privation en substrat Perturbation de la membrane
		Acide cinnamique	
	Acides phénoliques Quinones	Hypéricine	Liaison aux adhésines, complexe avec la paroi cellulaire, inactive les enzymes
		Chrysin	Liaison aux adhésines, Complexe avec la paroi cellulaire
	Flavonoïdes Flavones	Abyssinone	Inactive les enzymes Inhibe la transcriptase reverse du HIV
		Totarol	?
	Flavonols Tannins	Ellagitanine	Liaison aux protéines Liaison aux adhésines Inhibition des enzymes Privation en substrat Complexe avec la paroi cellulaire Perturbation de la membrane
		Coumarines	Warfarine
	Terpenoïdes, huiles essentielles		Capsaïcine
	Alcaloïdes		Berberine Pipérine
Lectines et polypeptides		Agglutinine spécifique du mannose Fabatine	Bloque la fusion ou l'adsorption virale Forme des ponts disulfures
Polyacétylènes		8S-Heptadeca-2(Z),9(Z)-diène-4,6-diyne-1,8-diol	?

2.3. Efficacité des plantes entières :

La phytothérapie à la différence de la médecine classique, recommande d'utiliser la plante entière, appelée aussi "totum" plutôt que des extraits obtenus en laboratoire. Une plante entière est plus efficace que la somme de ses composants, les plantes contiennent des centaines voire des milliers de substances chimiques actives. (Iserin *et al.*, 2001).

3. Les plantes médicinales sélectionnées :

Les plantes étudiées ont été choisies en fonction de leur emploi très fréquent en Algérie.

3.1. *Berberis vulgaris* (Berberidaceae) :

Berberis, nom arabe du fruit de la plante ; il signifierait *coquille* car les pétales creuses sont en forme de coquille.

Non scientifique : *Berberis vulgaris*. (L.)

Non commun français : Epine vinette.

Nom commun arabe : Aghris

3.1.1. Description botanique :

Arbuste à feuilles caduques, pouvant atteindre 2 à 3 m de haut. Branches et rameaux armés d'épines. Feuilles ovales, finement dentelées. Fleurs jaunes, très petites, en grappe. Le fruit est une baie oblongue, rouge. (Schauenberg et Paris, 2005).



Figure 1 : Photo de *Berberis vulgaris* (Wikipédia, 2012).

3.1.2. Classification :

a / Classification classique :

Règne : plantae

Division : magnoliophyta.

Classe : Magnoliopsida

Ordre : Ranunculales

Famille : Berberidaceae

Genre : *Berberis*

Espèce : *Berberis vulgaris*

b / Classification phylogénétique :

Ordre : Ranunculales

Famille : Berberidaceae

3.1.3. Habitat et culture :

Originnaire d'Europe, l'épine-vinette a été introduite en Amérique du Nord, où elle s'est acclimatée. L'écorce est récoltée au printemps ou en automne et les baies sont cueillies en automne. (Iserin *et al.*, 2001).

3.1.4. Effets et usages médicaux :

L'épine-vinette agit sur le fonctionnement de la vésicule biliaire en accroissant la production de bile et en soulageant les affections telles que douleurs et jaunisses. Grâce à ses fortes propriétés antiseptiques, elle soigne les dysenteries amibiennes, le choléra et autres infections gastro-intestinales similaires. L'écorce est astringente, antidiarrhéique, et favorise la cicatrisation du tube digestif. (Iserin *et al.*, 2001).

Toutes les parties de la plante *Berberis vulgaris* ont longtemps été utilisées comme un remède traditionnel pour le traitement de divers troubles de l'organisme, y compris le dysfonctionnement du foie, la vésicule biliaire, la diarrhée, l'indigestion et les maladies des voies urinaires. (Fallah Huseini *et al.*, 2010 ; Zovko Končić *et al.*, 2010).

L'écorce de la racine et la tige de *Berberis vulgaris* ont à la fois des propriétés médicinales et toxiques dues à la présence de berbérine, un alcaloïde isoquinoléine, présent la plupart du temps dans ces organes (**Bruneton, 1999**).

Les extraits de racine de *Berberis vulgaris* ont une activité antimicrobienne contre *Bacillus subtilis* NCTC 8236, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 10535, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Candida albicans* ATCC 10231 (**Kosalec et al., 2009**).

3.2. *Punica granatum* (Punicaceae) :

Nom scientifique : *Punica granatum* (L.)

Nom commun français : Grenadier commun

Nom commun arabe :



Figure 2 : Photo de *Punica granatum* (**Wikipédia, 2012**).

3.2.1. Description botanique :

Le grenadier est un arbre ou arbuste buissonnant de 2 à 5 m de hauteur, légèrement épineux, au feuillage caduc et au tronc tortueux. Il croît majoritairement dans toute la région méditerranéenne, de façon subspontanée ou cultivée (**Garnier et Bezanger-Beauquèsne, 1961**).

3.2.2. Classification :

a / Classification classique :

Règne : plantae

Division : magnoliophyta.

Classe : Magnoliopsida

Ordre : Myrtales

Famille : Punicaceae

Genre : *Punica*

Espèce : *Punica granatum*

b / Classification phylogénétique :

Ordre : Myrtales

Famille : Lythraceae

3.2.3. Origine géographique :

Le grenadier serait originaire d'Iran et d'Afghanistan, où il croît de façon spontanée depuis plus de 4000 ans. On le retrouve également sur des bas-reliefs égyptiens datant de 2500 ans avant le Christ et au jardin botanique de Thoutmosis III créé en 1450 avant JC. (**Amouretti et Comet, 1992**).

3.2.4. Propriétés pharmacologiques et thérapeutiques :

Les extraits d'écorce de grenade (péricarpe), obtenus à partir de solvants différents et testés sur six espèces bactériennes : *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis* et *Salmonella typhi*, ont montré une activité antibactérienne, quelle que soit l'espèce bactérienne cultivée. Néanmoins, l'extrait méthanolique semble posséder une activité antibactérienne plus importante que les autres extraits, essentiellement sur *S. aureus* (**Prashanth et al., 2001**).

La peau de grenade possède une activité fongistatique. En effet, elle est capable de bloquer la croissance, durant des périodes variées, de divers organismes fongiques telle que celle de *Penicillium citrinum* durant 8 jours, *Penicillium patulum* durant 4 jours, *Penicillium roquefortii* et *Aspergillus ochraceus* durant 3 jours (**Azzouz et Bullerman, 1982**).

4. Les infections nosocomiales :

Les infections contractées en milieu hospitalier, dites infections nosocomiales, constituent un problème de santé publique. L'émergence de la multirésistance chez les bactéries limite le choix thérapeutique et entraîne une augmentation du taux de mortalité, de morbidité, une durée prolongée de séjour hospitalier et un coût élevé (**Pechère et Vladoianu 1992 ; CCLIN., 1996**).

En Europe, l'incidence des infections nosocomiales représente 5,5 à 9,9 % des admissions à l'hôpital (**Maugat et al., 2001**). Ces infections dépendent de l'état du patient et sont favorisées par la technicité des actes et des traitements (**Berche et al., 1988**), ainsi qu'à la multirésistance des bactéries aux antibiotiques couramment utilisés en thérapie humaine (**Fridkin et al., 1999 ; Neely et al., 2000**).

L'environnement hospitalier joue un rôle important dans la transmission des microorganismes (**Boyce et al., 1997 ; Porwancher et al., 1997**). L'ampleur des infections nosocomiales est liée à la capacité des souches bactériennes à survivre plus ou moins longtemps dans l'environnement hospitalier (surfaces, paillasse, sol, murs, tables d'opération, air, matériel médical, tissus, etc.) (**Neely et al., 2000**).

5. Les Antibiotiques :

Les antibiotiques sont des substances chimiques élaborées naturellement par les microorganismes, semi-synthétiques ou synthétiques (**Lavigne, 2007**), capables d'inhiber la multiplication (action bactériostatique) ou de tuer (action bactéricide) d'autres microorganismes, sans avoir un effet toxique pour l'hôte (**Doublet, 2004**).

Les antibiotiques sont classés sur la base de leur structure chimique qui conditionne leurs principales propriétés bactériologiques (mode d'action, mécanisme de résistance, spectre), pharmacologiques (mode d'admission, diffusion, élimination) et toxicologiques (effets indésirables et contre-indications) (**Bosgiraud, 2003**). Ils sont également classés selon leurs sites d'action (figure 3).

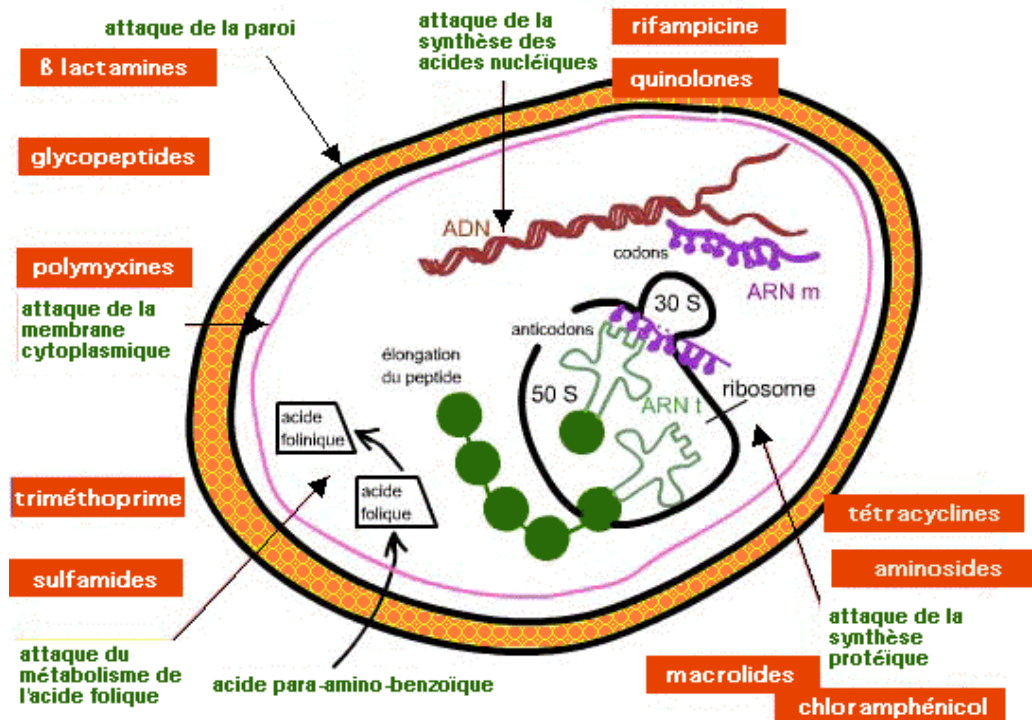


Figure 3. Classification des antibiotiques selon leurs sites d'action (Lavigne, 2007).

5.1. Les Bêta- lactamines :

Du fait de leur diversité, faible toxicité, activité bactéricide et large spectre d'action, les β -lactamines sont parmi les antibiotiques les plus utilisés dans les traitements des infections causées par les Enterobacteriaceae (Bonnet, 2006).

La structure de base des β -lactamines (figure 4) est le noyau azétidinone, qui contient la structure carbonyle lactame indispensable pour l'activité de ces molécules (Bryskier, 1999).

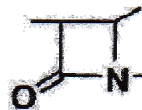


Figure 4. Cycle lactame (Cavallo *et al.*, 2004).

5.1.1. Classification :

Les β -lactamines, qu'elles soient naturelles ou produites par héli-synthèse, sont classées en fonction de la nature du noyau entrant dans leur structure de base (Soussy, 2000). On distingue, pénames, céphèmes, pénèmes, monobactames et les inhibiteurs de β lactamases (Figure 5).

5.1.1.1. Pénames (pénicillines) :

Il s'agit d'une vaste famille de produits ayant en commun le noyau péname, qui est caractérisé par un pentacycle saturé (cycle thiazolidine) associé au noyau β -lactame. Les produits de ce groupe se distinguent par la nature du radical fixé sur le carbone en position 6. Ce sont: les phénoxy-pénicillines et analogues de la pénicilline G, la méthicilline et les isoxazoly-pénicillines, les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les acyluréidopénicillines, les amidinopénicillines, les pénicillines sulfonées et les méthoxycarboxypénicillines (Cavallo *et al.*, 2004).

5.1.1.2. Céphèmes (Céphalosporines) :

Leur noyau de base associe un cycle β -lactame à un cycle hexagonal saturé (cycle dihydrothiazine) (Calderon et Sabundayo, 2007). Les nombreux radicaux de substitution expliquent les propriétés antibactériennes différentes des céphalosporines, justifiant leur distinction fonctionnelle en plusieurs générations, de spectre et d'intérêt clinique variables (Cavallo *et al.*, 2004).

5.1.1.3. Pénèmes :

Les pénèmes se caractérisent par la présence d'un cycle penta-atomique insaturé collé au cycle β -lactame. En fonction de l'hétéroatome fixé en position 1, on distingue trois groupes: les sulfopénèmes, les carbapénèmes et oxapénèmes (Bryskier, 1999).

5.1.1.4. Monobactames :

Se caractérisent par la présence du noyau monocyclique, azétidine, limité au cycle β -lactame. Seul l'aztréonam est à l'heure actuelle prescrit (Cavallo *et al.*, 2004).

5.1.1.5. Inhibiteurs de β -lactamases :

Il s'agit de l'acide clavulanique, sulbactam et tazobactam. Ce sont des β -lactamines qui possèdent une activité antibactérienne mais à des concentrations non compatibles en thérapeutique. Associés à une β -lactamine, ils en restaurent l'activité antibactérienne qu'elle n'avait plus du fait de son hydrolyse par des β -lactamases. Le sulbactam et le tazobactam sont des sulfones de l'acide pénicillanique, alors que pour l'acide clavulanique, le soufre du cycle thiazolidine est remplacé par un oxygène (clavame ou oxapéname) (Kazmierczak, 1999).

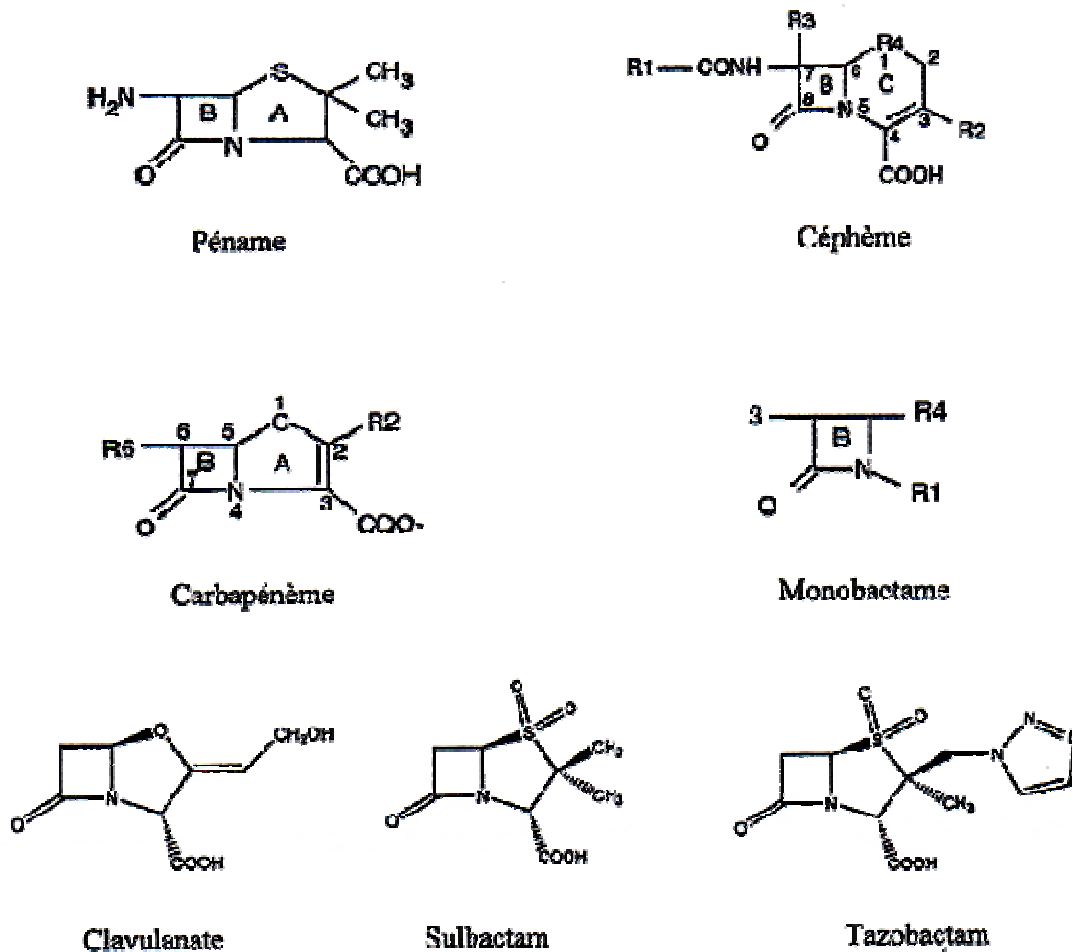


Figure 5. Principales structures des β -lactamines (Cavallo *et al.*, 2004 ; Bonomo, 2006).

5.1.2. Mécanisme d'action :

Toutes les β -lactamines ont le même mécanisme d'action, elles bloquent la synthèse du peptidoglycane, qui est le polymère majeur spécifique de la paroi des bactéries à Gram négatif et à Gram positif (Cavallo *et al.*, 2004). En effet, seules les cellules en croissance active sont touchées par ce type d'antibiotiques (Tortora *et al.*, 2003).

Les β -lactamines inhibent la réaction de transpeptidation en se fixant de manière covalente au site actif des transpeptidases, désignées très souvent comme Protéines Liant la Pénicilline (PLPs) ou Penicillin-Binding Proteins (PBPs) (Charlier *et al.*, 1998). Les PLPs sont présentes en quantité variable (de 3 à plus de 8) selon les espèces bactériennes et présentent des affinités différentes pour chaque famille de β -lactamines (Fisher et Meroueh, 2005).

Les β -lactamines sont capables d'inhiber l'activité de ces enzymes par acylation du résidu sérine du site actif des PLPs, formant ainsi un complexe covalent acylenzyme stable non catalytique (figure 6) (Van Hoof, 2001).

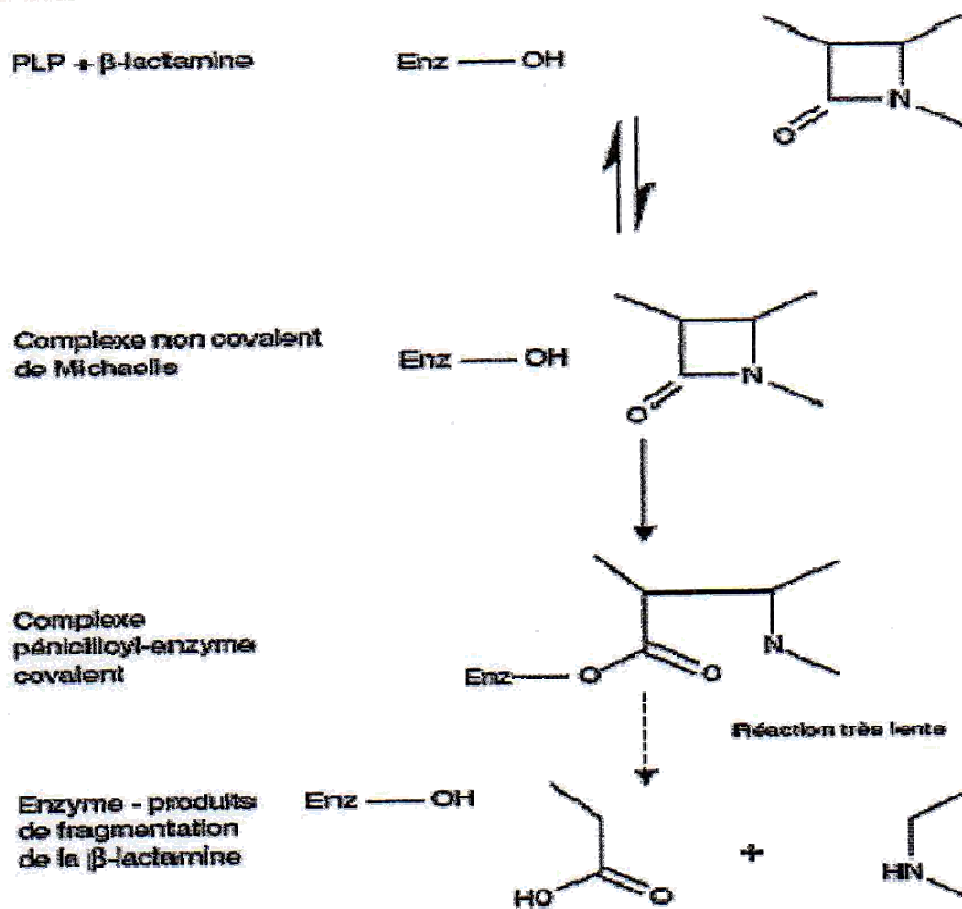


Figure 6 : Acylation du site actif d'une protéine de liaison à la pénicilline (PLP) par une β - lactamine (Livermore, 1995).

L'effet direct de l'inhibition de la synthèse de peptidoglycane dû aux β -lactamines est l'arrêt de la croissance bactérienne ou effet bactériostatique (Tankovic, 2000). Cependant, l'effet bactéricide résulte d'un phénomène secondaire déclenché par l'inhibition des PLPs. Il est initié par une altération du peptidoglycane qui induirait une activation dérégulée d'autolysines pariétales (muréine hydrolase et endopéptidase), conduisant à la lyse bactérienne (Bonnet, 2006).

5.2. Résistance aux antibiotiques :

Une souche est dite « résistante » quand elle supporte une concentration d'antibiotique notablement plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des autres souches de la même espèce (Faure, 2009).

5.2.1. Principaux mécanismes de résistance :

- La diminution de la perméabilité membranaire des bactéries à gram négatif.
- L'inactivation enzymatique.
- La modification du site d'action.
- L'augmentation de l'efflux (**Label et Soussy, 2007**).

La résistance aux antibiotiques est un facteur majeur compliquant le traitement des infections bactériennes et la dissémination des souches multirésistantes. Elle se caractérise par son caractère naturel ou acquis, son mécanisme et son support génétique (**Yala et al., 2001**). (Figure 7).

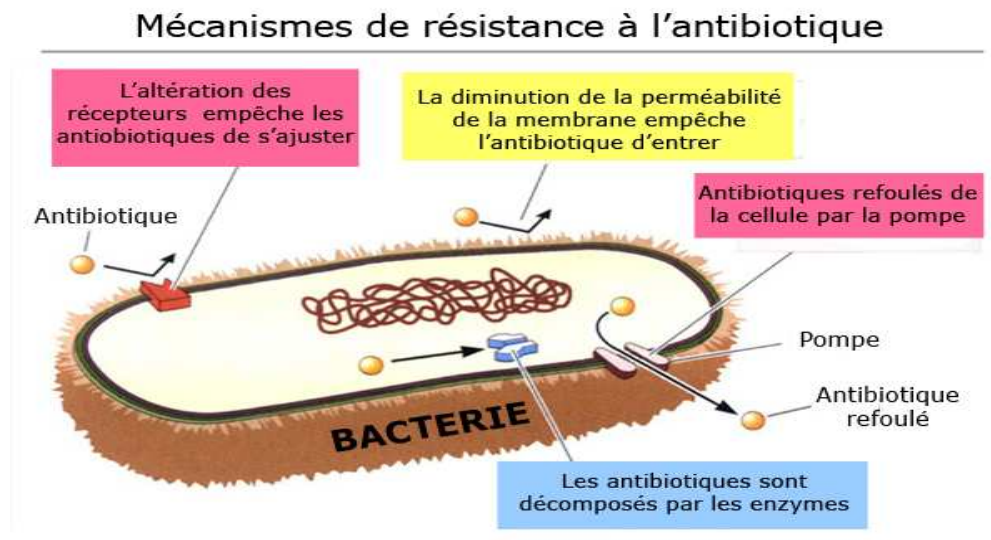


Figure 7: représentation des mécanismes de résistance aux antibiotiques (**Virginie, 2010**).

5.2.2. Résistance naturelle ou résistance intrinsèque :

La résistance intrinsèque est une caractéristique propre à une espèce bactérienne et partagée par toutes les souches de cette espèce. Elle peut être due à la présence d'un gène chromosomique commun à toutes les bactéries de l'espèce (**Faure, 2009**).

5.2.3. Résistance acquise :

Elle est présente seulement chez certaines souches de l'espèce. Cette résistance résulte d'une modification génétique par mutation ou d'une acquisition de matériel génétique étranger ;

- les résistances mutationnelles sont chromosomiques, spontanées, rares (fréquence de 10^{-6} à 10^{-9}) stable et transmissibles uniquement de façon verticale.
- les résistances par acquisition d'ADN sont la conséquence d'un transfert horizontal y compris entre espèces éloignées phylogénétiquement. Des gènes de résistances aux antibiotiques sont pour la plupart chromosomiques. Le transfert de ces gènes sera rendu plus efficace après leur intégrons ou encore sur des phages. Ces mécanismes de résistances peuvent alors diffuser très rapidement dans une population (**Faure, 2009**).

5.2.4. La "Multirésistance":

Il s'agit d'une terminologie très couramment utilisée même si elle ne répond pas à une définition univoque. Il est d'usage de parler de multirésistance pour « une bactérie qui, du fait de l'accumulation de résistances naturelles ou acquises, n'est plus sensible qu'à un petit nombre d'antibiotiques habituellement actifs en thérapeutique » ou pour « une bactérie sensible à moins de trois familles d'antibiotiques ». La multirésistance peut donc être acquise, mais aussi naturelle, comme par exemple pour *Burkholderia cepacia*, ou à un moindre degré pour *Acinetobacter spp.* Au total, ce terme s'emploie généralement pour une bactérie qui pose en général un problème de ressource thérapeutique (**Lozniewski et al., 2010**).

5.2.5. Principales bactéries multirésistantes :

La résistance aux antimicrobiens est un problème important et croissant dans le monde entier et représente un grave problème dans certaines régions géographiques (**Patzer et al., 2008**).

L'impact réel de cette résistance se manifeste surtout en milieu hospitalier, où les principaux types de pathogènes résistants ont augmenté au cours de ces dernières décennies.

Plus récemment, à côté de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM), le SARM à résistance hétérogène à la vancomycine est apparu, ceux-ci peuvent se développer en souches de *S. aureus* résistants à la vancomycine (SARV) ; et les entérocoques résistants à la vancomycine (ERV). Parmi les bactéries à Gram négatif, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Pseudomonas aeruginosa*, et le plus récemment, *Acinetobacter baumannii* (**Levy, 2001**). (Tableau 2).

Tableau 2 : Principales bactéries multirésistantes trouvées en milieu hospitalier (Levy, 2001).

Bactéries à Gram positif	Bactéries à Gram négatif
SARM SARM (RHV) → SARV ERV	<i>Klebsiella spp.</i> <i>Enterobacter spp.</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Acinetobacter baumannii</i>

SARM, *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline.

SARV, *Staphylococcus aureus* résistant à la vancomycine.

RHV, Résistance hétérogène à la vancomycine.

ERV, Entérocoques résistants à vancomycine.

Matériels
&
Méthodes

1. Matériel végétal :

Les racines de l'épine vinette (*Berberis vulgaris*) ont été achetées séchées au marché des plantes médicinales. Les fruits du grenadier (*Punica granatum*) ont été achetés au marché, et les écorces du fruit ont été isolées et séchées dans un endroit sec et à l'abri de la lumière. Le matériel végétal séché ainsi obtenu a été finement broyé dans un moulin électrique.

2. Préparation des extraits bruts méthanoliques :

5g de la poudre de chaque plante ont été immergés dans 50 ml (rapport matériel végétal/solvant est 1:10, p/v (**Eloff, 1998**)) de méthanol à 70 %, puis soumis à une extraction sou reflux à 70°C pendant 3h. Après, les extraits ont été filtrés à travers un papier filtre, et le filtrat a été évaporé à sec sous vide à 50°C, dans un évaporateur rotatif (HAHNVAPOR, modèle : HS-2005V). (**Kianbakht et Jahaniani, 2003**).

Les extraits secs ont été conservés sous forme de poudre, à 4 °C, dans des tubes à hémolyse fermés hermétiquement et à l'abri de la lumière.

Selon **Cos et al. (2006)**, une recommandation pratique pour la conservation des composés ou des extraits, est leur conservation sans solvant, pour un stockage à long terme.

▪ Calcul des rendements :

Les rendements en extrait sec ont été déterminés par la formule suivante :

$$Rdm (\%) = \frac{m}{M} \times 100$$

m : poids de l'extrait après évaporation,

M : poids de la matière végétale de départ.

3. Etude de l'activité antibactérienne des extraits des deux plantes :

3.1. Souches bactériennes testées :

Nous avons testé des souches bactériennes hospitalières, résistantes aux antibiotiques, appartenant à différentes espèces de bacilles à Gram négatif. Ces souches ont été prélevées à partir de selles d'enfants et des nourrissons ou de plaies infectées de malades hospitalisés au (C.H.U.) de Tlemcen.

L'isolement sélectif de ces souches bactériennes a été effectué au laboratoire, et leur identification a été confirmée par l'étude des caractères cultureux et biochimiques par l'utilisation de la galerie API 20 E.

Ces souches ont été choisies en fonction de leur résistance à plusieurs antibiotiques sur la base d'un antibiogramme préliminaire, en utilisant des antibiotiques (β -lactamines) couramment utilisées en milieu hospitalier.

Pour le contrôle interne, nous avons utilisé deux souches de référence, *Escherichia coli* ATCC 25922 sensible aux antibiotiques testés et *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 multirésistante aux antibiotiques (Tableau 3).

Tableau 3 : Souches bactériennes utilisées.

Souches	Service /Origine du prélèvement
<i>Escherichia coli</i>	Néonatalogie (Selles)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
<i>Enterobacter cloacae</i>	
<i>Salmonella spp.</i>	
<i>Proteus mirabilis</i>	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Médecine interne (pus)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Laboratoire Produits Naturels
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	Laboratoire Produits Naturels

3.2. Les milieux de cultures utilisés :

Boillon nutritif

Bouillon Mueller-Hinton

Gélose nutritive.

Gélose Mueller-Hinton.

3.3. Préparation de l'inoculum :

Chaque souche est ensemencée au préalable sur une gélose nutritive, pour obtenir une culture de 18 à 24 h. Ensuite, 4 à 5 colonies bactériennes bien isolées sont mis en suspension dans un bouillon nutritif (ou en eau physiologique à 0,9 % NaCl). Puis cette suspension est ajustée au standard Mc Farland 0,5 à l'aide d'un spectrophotomètre, correspondant à une

densité optique DO entre 0,08 à 0,1 lue à 625 nm, ce qui correspond à une suspension contenant environ 10^8 UFC/ ml (CA-SFM, 2010).

3.4. Méthode de diffusion des disques sur milieu solide :

L'ensemencement est réalisé par écouvillonnage à partir d'un inoculum dilué au 1/10 (environ 10^7 UFC/ml) (CA-SFM, 2010). À l'aide d'un écouvillon stérile, introduit dans la suspension bactérienne et essoré contre la paroi interne du tube, réaliser des stries parallèles et aussi serrées que possible à la surface d'une boîte de Pétri préalablement coulée avec la gélose de Mueller- Hinton. Répéter l'opération deux fois en tournant la boîte 60° et en tournant l'écouvillon sur lui-même.

Des disques de papier filtre, de 6 mm de diamètre, sont préparés et stérilisés. Ils sont ensuite imprégnés de 10 μ l de l'extrait testé dilué dans du DMSO pur, et déposés à la surface de la boîte de Pétri ensemencée. La quantité finale d'extrait sur le disque est 1 mg/disque. Pour chaque type d'extrait, l'opération est répétée trois fois.

Deux disques témoins sont déposés sur la même boîte ; un disque contenant 10 μ l de DMSO pur et un disque d'amoxicilline/Ac. Clavulanique (20/10 μ g). Les boîtes de Pétri sont laissées sur la paillasse au moins 15 min pour une prédiffusion de l'extrait avant d'être incubées à 37°C pendant 24 h.

La lecture des résultats se fait par la mesure, à l'aide d'une règle graduée, du diamètre de la zone d'inhibition formée autour du disque, en prenant la moyenne des trois essais effectués. (Gulluce *et al.*, 2007).

3.5. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice en milieu liquide :

La détermination de la CMI est réalisée pour l'extrait qui a révélé une activité antibactérienne par la technique de diffusion sur gélose, en utilisant une microplaque stérile (8×12 puits).

Déposer, stérilement, 0,1 ml du bouillon Mueller-Hinton dans les puits d'une même ligne. Ensuite, rajouter 0,1 ml de l'extrait à tester dans le 1^{er} puits, bien mélanger le contenu du puits. Transférer ensuite 0,1 ml de puits en puits, pour obtenir des dilutions au facteur $\frac{1}{2}$. Enfin, déposer 0,1 ml de l'inoculum préalablement dilué au 1/100 (environ 10^6 UFC/ml) dans chaque puits pour avoir une concentration finale de $5 \cdot 10^5$ UFC/ml. Les concentrations finales en extrait vont de 12,8 à 0,0125 mg/ml.

La microplaque est couverte et incubée à 37 °C pendant 24h. Le DMSO doit être à raison de 2 % au maximum. La lecture est effectuée à l'œil nu et la CMI est la plus faible concentration de l'extrait à laquelle aucun trouble n'est observé (**EUCAST, 2003**).

Résultats
&
Discussion

Résultats et discussion

1. Calcul des rendements :

Les extraits secs des racines de l'épine vinette (*Berberis vulgaris*) et des écorces des fruits du grenadier (*Punica granatum*) ont été obtenus par extraction dans le méthanol à 70%, sous reflux.

Le poids de l'extrait sec permet de calculer le rendement. Les résultats du calcul des rendements obtenus sont reportés dans le Tableau 4.

Tableau 4: Rendements en extraits secs des deux plantes étudiées.

plantes	Partie utilisée	Rendement %
<i>Berberis vulgaris</i>	Racines	17,98
<i>Punica granatum</i>	Ecorces de fruits	35,07

Pour une même quantité de matériel végétal de départ, les extraits secs méthanoliques des écorces de fruits du grenadier (*Punica granatum*) représentent des rendements deux fois plus élevés (35,07%) par rapport à ceux des racines de l'épine vinette (*Berberis vulgaris*)(17,98%).

Le rendement calculé de l'écorce du fruit de grenadier est supérieur à celui trouvé en **2001**, par **Prashanth** et ces collaborateurs ; où le rendement de l'extrait méthanolique de l'écorce de fruits de *Punica granatum* était de 30%.

Le rendement de l'extrait sec de *Berberis vulgaris* obtenu dans notre étude, est nettement inférieur à l'extrait éthanolique obtenu par (**Zovko Končić et al., 2010**) qui variait de 66,0% à plus de 68%.

Cette grande différence est probablement due à plusieurs facteurs, comme l'origine géographique et climatique, la fraîcheur des fruits utilisés et la méthode d'extraction.

2. Etude de l'activité antibactérienne des extraits étudiés :

Notre travail consiste à l'étude de l'activité antibactérienne des extraits méthanoliques des racines de *Berberis vulgaris* et les écorces de fruits de *Punica granatum* vis-à-vis de sept (7) souches bactériennes à Gram négatif et dont leur multirésistance aux antibiotiques a été préalablement testée et confirmée par un test d'antibiogramme en utilisant des antibiotiques β - lactamines.

Pour l'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits, nous avons utilisé la technique de diffusion des disques sur milieu gélosé, et l'activité est mesurée en fonction des diamètres des zones d'inhibition formés autour du disque. Nous avons comparé l'activité des deux extraits à celle de l'association Amoxicilline + cide clavulanique (AMC, 20/10 $\mu\text{g/ml}$).

Les résultats obtenus sont regroupés dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Moyenne des diamètres des zones d'inhibition (mm) des extraits de *Berberis vulgaris* et *Punica granatum*.

Souches	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Salmonella spp.</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603
<i>Berberis vulgaris</i>	09,0	07,7	08,8	07,4	08,0	07,0	07,8	07,2	06,6
<i>Punica granatum</i>	08,5	07,8	08,6	08,0	20,5	09,6	13,8	08,0	08,2
Amoxicilline/ ac. Clav (AMC, 20/10 $\mu\text{g/ml}$)	14,0	18,0	09,0	19,0	14,0	06,0	06,0	23,0	20,0

D'après les résultats ci-dessus, nous remarquons une très faible activité des extraits des deux plantes étudiées vis-à-vis des différentes souches bactériennes testées, y compris les souches de référence.

Ces résultats, et malgré le fait que cette technique a été réalisée dans des conditions standards, sont dues probablement à plusieurs facteurs intrinsèques et extrinsèques qui pourraient influencer d'une façon directe ou indirecte sur l'activité de ces extraits ; nous pouvons citer à titre d'exemple :

- Le système de solvant utilisé,
- La taille des particules de la poudre,
- La composition chimique des extraits,
- La température élevée qui pourrait dégrader les composés actifs.

Par contre, nous observons une activité plus ou moins importante de l'extrait des écorces de fruit du grenadier vis-à-vis de deux souches hospitalières, *Acinetobacter baumannii* et *Proteus mirabilis*, avec des moyennes de diamètres d'inhibition de 13,8 et 20,5 mm respectivement. Ces diamètres sont mêmes supérieurs à ceux obtenus par l'antibiotique utilisé (Amoxicilline/ac.clav.), 06 et 14 mm respectivement.

Selon **Ahmed et al., (1998)**, les extraits alcooliques d'écorces de fruits de *Punica granatum* sont moyennement actifs sur des souches bactériennes de référence, à Gram négatif avec des diamètres de 10 à 19 mm.

L'extrait méthanol/eau des écorces de fruit de grenadier avait donné des diamètres d'inhibition de 16, 16 et 18 mm pou *E. coli*, *K. pneumoniae* et *P. aeruginosa* respectivement (**Al-Zoreky et al., 2009**).

3. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice en milieu liquide :

Du fait de l'activité obtenue de l'extrait des écorces de *Punica granatum* contre les deux souches multirésistantes, par rapport à celui de *Berberis vulgaris* qui n'a présenté aucune activité, nous avons choisi de déterminer les la concentration minimale inhibitrice de cet extrait vis-à-vis des mêmes souches bactériennes, en utilisant la méthode des dilutions en milieu liquide. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 6 : Concentration minimale inhibitrice de l'extrait des écorces de *Punica granatum*.

Souches	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Salmonella spp.</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603
<i>Punica granatum</i> (mg/ml)	□ 12,8	□ 12,8	□ 12,8	□ 12,8	3,2	3,2	1,6	□ 12,8	□ 12,8
Amoxicilline/ ac. Clav. (µg/ml)	16	8	32	8	16	□ 128	□ 128	2	8

D'après le tableau, nous pouvons remarquer que les espèces *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Proteus mirabilis* sont les plus sensibles à l'extrait des écorces du fruit de grenade (*Punica granatum*) par rapport aux autres souches testées, avec des valeurs de CMI de 1,6 mg/ml pour *A. baumannii* et 3,2 mg/ml pour *P. aeruginosa* et *P. mirabilis*.

Pour les autres espèces bactériennes, les valeurs de CMI sont supérieures à la valeur supérieure qui est 12,8 µg/ml.

Les valeurs de CMI obtenues dans notre étude sont relativement inférieures à celles trouvées par **Prashanth** et ces collaborateurs en **2001**, qui étaient de l'ordre de 12, 12, 1,5 et 12 mg/ml pour *E. coli* MTCC 737, *K. pneumoniae* MTCC 109, *P. vulgaris* MTCC 1771 et *S. typhi* MTCC 537, respectivement.

Ces résultats révèlent des valeurs de CMI de l'extrait étudié nettement supérieures à celles de l'antibiotique chimique, et confirment les résultats obtenus par la technique de diffusion.

Conclusion
Générale

Le présent travail portant sur l'étude d'extraits méthanoliques de *Berberis vulgaris* (L) et *Punica granatum* (L), nous a permis de tirer un certain nombre de conclusions :

Tout d'abord, le calcul de rendement nous a révélé des différences entre les deux espèces. Ainsi celui de *Punica granatum* (L) est le plus important (35,07%) par rapport à celui de *Berberis vulgaris* (L) (17,98%).

L'étude de l'activité antibactérienne des extraits méthanoliques des deux plantes étudiées a révélé une faible activité de ces extraits vis-à-vis des différentes souches bactériennes testées, y compris les souches de référence.

Néanmoins, nous avons trouvé une activité importante de l'extrait des écorces de fruit du grenadier vis-à-vis des hospitalières *Acinetobacter baumannii* et *Proteus mirabilis*, avec des moyennes de diamètres d'inhibition de 13,8 et 20,5 mm respectivement.

Les valeurs des CMI de l'extrait de *Punica granatum* vis-à-vis des espèces *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Proteus mirabilis* sont les plus faibles (1,6 ; 3,2 ; 3,2 mg/ml). Ces résultats confirment ceux obtenus par la technique de diffusion.

A la suite de ces résultats, il serait donc intéressant d'approfondir la recherche sur ces extraits afin de mettre en évidence toutes les propriétés de ces deux plantes potentiellement intéressantes :

Il serait souhaitable ainsi de faire d'autres essais, en réalisant l'extraction avec d'autres systèmes de solvants, et par macération agitée.

Un fractionnement des extraits serait nécessaire pour déterminer leur composition chimique et identifier la fraction active.

Il serait aussi intéressant de voir l'effet de l'extrait de *Punica granatum* sur d'autres micro-organismes pathogènes tels que des bactéries à Gram positif, des levures et des moisissures et faire des essais *in vivo*.

Enfin, compte tenu de l'importance phytothérapeutique des extraits des plantes médicinales, nous espérons qu'elles prendront une place en thérapie hospitalière afin de palier aux problèmes de résistances bactériennes causées par la pression de sélection des antibiotiques dans le milieu hospitalier.

Références
Bibliographiques

« A »

1. **Ahmad I., Mehmood Z. et Mohammad F. 1998.** Screening of some Indian medicinal plants for their antimicrobial properties. *J. Ethnopharmacol*; 62: 183–193.
2. **Al-Zoreky N.S. 2009.** Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum L.*) fruit peels. *International Journal of Food Microbiology*; 134 : 244–248.
3. **Amouretti M.C., Comet G. 1992.** Cahier d'histoire des techniques – Des hommes et des plantes : plantes méditerranéennes, vocabulaire et usages anciens. Publications de l'Université de Provence. 174 p.
4. **Arrif S. 2009.** Etude des métabolites secondaires de deux scrophulariacées du genre *Verbascum*: *V. ballii* et *V. dentifolium*. Thèse de Doctorat en Sciences. Université El Hadj Lakhdar- Batna. Faculté des Sciences. Département de Chimie. 172 p.
5. **Azzouz M. A., Bullerman L. B. 1982.** Comparative antimycotic effects of selected herbs, spices, plant components and commercial antifungal agents. *Journal of food protection*; 45: 1248-1301.

« B »

6. **Bahorum T. 1997.** Substances naturelles Actives : La flore Mauricienne, Une Source D’approvisionnement Potentielle. AMAS. Food and Agricultural Research Council Scientific Correspondence.
7. **Banomo A.R. 2006.** B-Lactam/B-Lactamase Inhibitor. *In* : Yoshikawa T, Rajagopalan S. Antibiotic Therapy for Geriatric Patients. New York : Taylor & Francis Group, LLC.P : 141-153.
8. **Baudoux D. 2001.** L’aromathérapie. Se soigner par les huiles essentielles. 2^{èmes} Ed, Atlantica.
9. **Belaïche P. 1979.** Traité de phytothérapie et d’aromathérapie, Ed Maloine, Tome 1, Paris.
10. **Belaïche P. 1983.** La phytothérapie, sont pragmatisme et ses limites, *Tempo médical*, 146, 29-33,
11. **Benmerabet K., Abed L. 1982.** Quelques aspects de la pharmacopée traditionnelle algérienne. *Le pharmacien du Maghreb*, spécial n°2.

12. **Berche P., Gaillard J.L., Simonet M. 1988.** Bactériologie. Les bactéries des infections humaines. « De la biologie à la clinique ». Ed. Flammarion, 649 p.
13. **Bonnet R. 2006.** B-lactamines et entérobactéries. *In: Courvalin P, Bingen E.* antibiogramme. Paris. ESKA/ 2^{ème} Edition. p 143.
14. **Bosgiraud C. 2003.** Microbiologie générale et santé. Paris : ESKA. P : 278.
15. **Boulos L. 1983.** Medicinal plants of North Africa, reference publication Inc.
16. **Boyce J.M., Potter-Bynoe G., Chenevert C., King T. 1997.** Environmental contamination due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: possible infection control implications. *Infect. Control Hosp. Epidemiol*; 18 (9): 622-627.
17. **Brunetton, J., 1999.** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales. Lavoisier, Paris. p. 921.
18. **Bryskier A. 1999.** Antibiotiques Agents Antibactériens et Antifongiques. Paris : Ellipses. p. 55.

« C »

19. **Calderon C.B, Sabundayo B.P. 2007.** Antimicrobial Classifications: Drugs for Bugs. *In: Schwalbe R, Steele-Moore L, Goodwin A.C.* Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols. New York: Taylor & Francis Group, LLC. p : 9-48.
20. **CA-SFM. 2010.** Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Sur le lien : <http://www.sfm.asso.fr/>
21. **Cavallo J.D, Fabre R, Jeht F, Rapp C, Garrabé E. 2004.** β- Lactamines. *EMC- Maladies Infectieuses* ; 1 :129-202.
22. **CCLIN Sud-Est. 1996.** Réseau ISO Sud-Est : un an de surveillance des infections du site opératoire. *Bull. Epid. Heb.* 42 : 183-185.
23. **Charlier P, Coyette J, Dehareng D, Dive G, Duez C, Dusart J, Fonzé E, Fraipont C, Frère J.M, Galleni M, Goffin C, Joris B, L amotte-Brasseur J, Nguyen-Distèche M. 1998.** Résistance bactérienne aux beta-lactamines. *Médecine-Science.* 14 : 544-555.
24. **Cos P., Arnold J.V., Dirk V.B. et Louis M. 2006.** Anti-infective potentiel of natural products: How to develop a stronger in vitro “proof-of-concept”. *J. Ethnopharmacol*; 106: 290-302.
25. **Cowan, M.M. 1999.** Plant products as antimicrobial agents. *Clinic. Microbiol. Rev.*, 12: 564-582.

« D »

26. **Doublet B. 2004.** Caractérisation des éléments génétiques mobiles du gène de résistance au florfénicole flor R chez *Salmonella enterica* et *Escherichia coli*. Thèse de Doctorat. Discipline des sciences de la vie et de la santé. Université de Tours.

« E »

27. **Eloff J.N. 1998.** Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants? *J. Ethnopharmacol*; 60: 1–8.
28. **European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and infectious diseases (ESCMID). 2003.** Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antimicrobial agents by broth dilution. *Clinical Microbiology and Infection*; 1-7.

« F »

29. **Fallah Huseini H., Zareei Mahmoudabady A., Ziai S. A., Mehrasma M., Alavian S. M., Kianbakht S, Mehdizadeh M. 2010.** The Effects of *Taraxacum officinale* L. and *Berberis vulgaris* L. root extracts on carbon tetrachloride induced liver toxicity in rats. *Journal of Medicinal Plants*. Vol. 9. (Suppl. 6): 45 – 52.
30. **Farnsworth N. R., Akerele O., Bingel A. S., Soejarto D. D. et Guo Z. 1986.** Places des plantes médicinales dans la thérapeutique. Bulletin de L'Organisation Mondiale de la Santé., 64 (2) : 159-164.
31. **Faure S. 2009.** Transfert d'un gène de résistance aux B-lactamines bla.CTX-M-9 entre *Salmonella* et les entérobactéries de la flore intestinale humaine : impact d'une antibiothérapie, Equipe d'accueil : unité Pharmacocinétique-Pharmacodynamie, AFSA Ecole Doctorale : Vie-Agro-Santé.
32. **Fisher J.F, Meroueh S.O , Mobashery S. 2005.** Bacterial Resistance to B-Lactam Antibiotic: Compelling Opportunism, *Compelling. chem. rev.* 105: 395-424.
33. **Fridkin (S.K.), Steward (C.D.), Edwards (J.R.), Pryor (E.R.), McGowan (J.E. Jr.), Archibald (L.K.), Gaynes (R.P.), Tenover (F.C.). 1999.** Surveillance of antimicrobial use and antimicrobial resistance in United States hospitals: project ICARE phase 2. Project Intensive Care Antimicrobial Resistance Epidemiology (ICARE) hospitals. *Clin. Infect. Dis.*, 29(2) : 245-252.

« G »

34. **Garnier G., Bezanger-Beauquesne L., Debraux G.1961.** Ressources médicinales de la flore française. Ed. Vigot Frères. Tome II. 1511 p.
35. **Gulluce M., Sahin F., Sokmen M., Ozer H., Daferera D., Sokmen A., Polissiou M., Adiguzel A. et Ozkan H. 2007.** Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L. ssp. *longifolia*. *Food Chemistry*; 103: 1449–1456.
36. **Gurib-Fakim A. 2006.** Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*; 27: 1–93.

« H »

37. **Hans W. K. 2007.** 1000 plantes aromatiques et médicinales. Terre édition. p 6-7.

« I »

38. **Iserin P., Masson M., Restellini J. P., Ybert E., De Laage de Meux A., Moulard F., Zha E., De la Roque R., De la Roque O., Vican P., Deesalle –Féat T., Biaujeaud M., Ringuet J., Bloth J. et Botrel A. 2001.** Larousse des plantes médicinales : Identification, préparation, soins. Ed Larousse. p10-12.

« K »

39. **Kazmierczak A. 1999.** Inhibiteurs des B-lactamases. In : Bryskier .A. antibiotiques Agents antibactériens et antifongiques. Paris : Ellipsees. p 446-457.
40. **Kianbakht S., et Jahaniani F. 2003.** Evaluation of Antibacterial Activity of *Tribulus terrestris* L. Growing in Iran. *Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics*; 2: 22-24.
41. **Kosalec, I., Gregurek, B., Kremer, D., Zovko, M., Sankovic' , K., Karlovic' , K., 2009.** Croatian barberry (*Berberis croatica* Horvat): a new source of berberine – analysis and antimicrobial activity. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 25 : 145–150.

« L »

42. **Label B., Soussy C.J. 2010.** Résistance bactérienne aux ATB, Ed : Springer.
43. **Lavigne J.P. 2007.** Effet des antibiotiques et mécanismes de résistance. cours de bactériologie. Faculté de Médecine Montpellier-Nîmes.
44. **Levy S. B. 2001.** Antibiotic Resistance: Consequences of Inaction. *Clinical Infectious Diseases*, 33 (Suppl. 3) :124–129.
45. **Livermore D. M. 1995.** Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 8:557-584.
46. **Lozniewski a., Rabaud c., Nancy. 2010.** Fiches conseils pour la prévention du risque infectieux – Infections associées aux soins (CCLIN Sud-Est).

« M »

47. **Marc T., Gérard W., Denis L. 2001.** Classification des anti-inflammatoires, in : Guide de pharmacologie. Etudiants et professionnels paramédicaux. 4^{ème} Ed. 426p.
48. **Maugat S., Carbonne A., Astagneau P. 2003.** Réduction significative des infections nosocomiales : analyse stratifiée des enquêtes de prévalence conduites en 1996 et 2001 dans l'inter-région Nord. *Pathol. Biol.*, 51(8-9) : 483-489.
49. **Millogo H., Guisson I. P., Nacoulma O. et Traore A. S. 2005.** Savoir traditionnel et médicaments traditionnels améliorés. Colloque du 9 décembre. Centre européen de santé humanitaire –Lyon.

« N »

50. **Nacoulma O. G. 1996.** Plantes médicinales et pratiques médicales traditionnelles au Burkina Faso: cas du Plateau central. Thèse de Doctorat d'État. Université de Ouagadougou, Burkina Faso. Tome I et II. 581 p.
51. **Neely A.N., Maley M.P. 2000.** Survival of *Enterococci* and *Staphylococci* on hospital fabrics and plastic. *J. Clin. Microbiol.*, 38(2) : 724-726.

« P »

52. **Patzer J. A., Dzierzanowska D., Turner P. 2008.** Trends in antimicrobial susceptibility of Gram-negative isolates from a pediatric intensive care unit in Warsaw: results from the MYSTIC program (1997–2007). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62 : 369–375.
53. **Pechère J.C., Vladoianu I.R., 1992.** Development of resistance during ceftazidime and cefepime therapy in murine peritonitis model. *J. Antimicrob. Chemother*; 29: 563-573.
54. **Penge O. 1992.** Rôle et importance de la conservation de la forêt tropicale pour la recherche pharmaceutique. *Revue Médecine & pharmacopée africaines*, Vol. 6 : 135-158.
55. **Porwancher R., Sheth A., Remphrey S., Taylor E., Hinkle C., Zervos M. 1997.** Epidemiological study of hospital-acquired infection with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. Possible transmission by an electronic ear-probe thermometer. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, 18(11): 771-783.
56. **Prashanth D., Asha M.K., Amit A. 2001.** Antibacterial activity of *Punica granatum*. *Fitoterapia*; 72 : 171-173.

« S »

57. **Schauenberg P. et Paris F. 2010.** Guide des plantes médicinales. Ed. Delachaux et Niestlé.
58. **Soussy C.J. 2002.** Antibiotiques, généralisés. In : Freney J, Renaud F, Hansen W, Boillet C. Précis de bactériologie clinique. Paris : ESKA. p 557-569.

« T »

59. **Tankovic J. 2000.** Mécanismes d'action des antibiotiques. Précis de bactériologie clinique. Ed. ESKA. p 584-595.
60. **Tortora G.J, Funke B.R, Case C.L. 2003.** Introduction à la microbiologie. Ed : Renouveau pédagogique.

« V »

61. **Van Hoof P. A. M. 2001.** Molecular modeling studies with regard to the observed resistance profile of *Streptococcus pneumoniae* PBP2X resulting from some naturally occurring active site mutation. PhD Thesis. Heinrich-Hein-Universität Dusseldorf, Dusseldorf (Germany). p238.
62. **Virginie H. V. 2010.** Les céphalosporines de 3^{ème} et 4^{ème} génération. Service de maladies infectieuses et tropicales (CHU) Grenoble.

« W »

63. **Wikipédia. 2012.** L'encyclopédie libre (en ligne) : <http://www.wikipédia.com>

« Y »

64. **Yala D, Merad A. S, Mouhamedi D, Ouar Korich M.N. 2001.** Résistance Bactérienne aux Antibiotiques. *Médecine Du Maghreb*. 91: 13-14.
65. **Yano, Y., Satomi, M., Oikawa, H. 2006.** Antimicrobial effect of spices and herbs on *Vibrio parahaemolyticus*. *International J. Food Microbiology*, 111: 6-11.

« Z »

66. **Zovko Končić M., Kremer D., Karlović K., Kosalec I. 2010.** Evaluation of antioxidant activities and phenolic content of *Berberis vulgaris* L. and *Berberis croatica* Horvat. *Food and Chemical Toxicology*. 48 : 2176–2180.

Annexe

Annexe : Composition chimique des milieux de culture utilisés.

- Bouillon nutritif :

Sa formule est la suivante :

Macération de viande (eau distillée + extrait de viande q.s.)	1 litre
Peptone tryptique	15 g
NaCl ou KCl	5 g

pH final 7,2 – 7,4

Stériliser à 115 °C pendant 20 min.

- Gélose nutritive : (bouillon nutritif solidifié par addition d'agar- agar).

Macération de viande (eau distillée + extrait de viande q.s.)	1 litre
Peptone tryptique	15 g
NaCl ou KCl	5 g
Agar	15 à 20 g

pH final 7,2 – 7,4

Stériliser à 115 °C pendant 20 min.

- Bouillon Cœur- Cervele : B.H.I.

Sa formule (g/l) est la suivante :

Infusion de cervelle de veau	200,0
Infusion de cœur de bœuf	250,0
Peptone de gélatine	10,0
Chlorure de sodium	5,0
Phosphate disodique	2,5
Glucose	2,0
(+ agar si milieu gélosé)	

pH final 7,2 – 7,6

Stériliser à 121 °C pendant 15 min.

- Milieu de MacConkey :

Sa formule (g/l) est la suivante :

Peptone de caséine	17,0
Peptone de viande	3,0
Lactose	10,0
Mélange de sels biliaries	1,5
Chlorure de sodium	5,0
Rouge neutre	0,03
Cristal violet	0,001
Agar- agar	13,5

pH final 7,1

Stériliser à 120 °C pendant 15 min.

- Milieu de Mueller- Hinton:

Sa formule (g/l) est la suivante :

Infusion de viande de bœuf	300,0
Hydrolysate de caséine	17,5
Amidon	1,5
Gélose	17,0

pH final 7,4

Stériliser à 121 °C pendant 15 min.

Résumé

Le présent travail portant sur l'étude d'extraits méthanoliques des racines de *Berberis vulgaris* (L.) et des écorces de fruits de *Punica granatum* (L.), a pour but d'évaluer leur activité antibactérienne contre les bactéries multirésistantes aux antibiotiques isolés du milieu hospitalier.

Le rendement en extrait de *Punica granatum* (35,07%) est deux fois supérieur à celui de *Berberis vulgaris* (17,98%).

L'activité antibactérienne a été testée par la méthode de diffusion des disques sur gélose, et a révélé une faible activité des deux extraits vis-à-vis des souches testées, sauf pour l'extrait de *P. granatum* qui a présenté une activité modérée contre *Acinetobacter baumannii* et *Proteus mirabilis* (diamètres de 13,8 et 20,5 mm).

Les CMI de l'extrait de *P. granatum* ont été déterminées par la méthode de dilution en milieu liquide, et elles étaient en concordance avec les résultats obtenus par la technique de diffusion.

Mots clés : *Berberis vulgaris* (L.), *Punica granatum* (L.), Extraits méthanoliques, Activité antibactérienne, CMI.

Abstract

The present work on the study of methanol extracts of the roots of *Berberis vulgaris* (L.) and fruit peels of *Punica granatum* (L.), intended to evaluate their antibacterial activity against multiple resistant hospitalable bacteria.

The yield of extract of *Punica granatum* (35.07%) is twice that of *Berberis vulgaris* (17.98%).

The antibacterial activity was tested by the disk diffusion method on solid medium, and showed a low activity of both extracts against the tested strains, except for the extract of *P. granatum* which presented moderate activity against *Acinetobacter baumannii* and *Proteus mirabilis* (diameters of 13.8 and 20.5 mm).

The MICs of the extract of *P. granatum* were determined by the dilution method in liquid medium, and were in accordance with results obtained by the diffusion technique.

Keywords: *Berberis vulgaris* (L.), *Punica granatum* (L.), methanol extracts, Antibacterial activity, MICs.