

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Saad Dahlab- Blida-1-
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie et Physiologie Cellulaire
Laboratoire de Biotechnologies, Environnement et Santé



Mémoire de Fin d'Etudes

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Sciences de la Nature et de la Vie

Option : MICROBIOLOGIE

THEME :

Étude de l'effet antibactérien in vitro des extraits polyphénolique de la peau de grenade «*Punica granatum* » vis-à-vis des souches d'entérobactéries productrices de Bêta-Lactamase à Spectre Etendu

Présenté par :

soutenu le : 02 Juillet 2018

- ❖ M^{lle} HADDOU Samira
- ❖ M^{lle} MESSIKA Asmaa
- ❖ M^{lle} NAZOUN Soumia

Devant les membres du jury :

Présidente	M ^{me} HAMAIDI F.	MCA	Université Blida 1
Examineur	Mr. BOUKHATEM M.N	MCA	Université Blida 1
Promotrice	M ^{me} DEBIB A.	MCB	Université Blida 1
Co-promoteur	Mr. CHITOUR A.	Médecin assistant en Microbiologie l'EHS (kettar)	

Année universitaire : **2017/2018**

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
I	Score d'identification bactérienne dans le système Microflex LT (Bruker Daltonics).	30
II	Liste des Antibiotiques utilisés dans le cadre de notre étude.	33
III	Répartition des cas positifs et négatifs selon le type de prélèvement	45
IV	Description de différentes colonies isolées	46
V	Scores d'identification bactérienne obtenue par MALDI-TOF	48
VI	Résultats de l'antibiogramme des 20 souches BLSE positifs vis-a-vis les antibiotiques testés.	55
VII	Les composés phénoliques identifiés dans les extraits du fruit <i>Punica granatum</i>	62
VIII	Rendement des extraits	Annexe III
IX	La gamme d'étalonnage de l'acide gallique	Annexe III
X	Teneur des polyphénols totaux en mg EAG/100g de grenade	Annexe III
XI	Les souches concernées par les tests et leurs sources	Annexe III
XII	Tableau de lecture de la galerie API 20 ^E .	Annexe III
XIII	Aspect macroscopique et orientation d'identification des genres de la famille des <i>Enterobacteriaceae</i> .	Annexe II

Liste des figures

N°	Titre	Page
01	Fleurs et fruits du Grenadier (<i>Punica granatum</i>).	04
02	Structure du fruit <i>Punica granatum</i> .	05
03	Présentation schématique des différentes parties du fruit de grenade et leur composition.	08
04	Inhibition de la croissance d'une culture de <i>Staphylococcus aureus</i> par la Moisissure <i>Penicillium notatum</i> .	11
05	Structure générale des bêta-lactamines.	12
06	Mode d'action des β -lactamines.	14
07	Schéma réactionnel de l'ouverture du cycle bêta-lactame par les bêta-lactamases.	20
08	Représentation de la variété grenade utilisée dans notre étude	23
09	Protocole expérimental pour l'évaluation de l'activité antibactérienne	24
10	Principe de la technique MALDI-TOF-MS	31
11	Schéma de détection de BLSE par le test du double disque.	37
12	Préparation du matériel végétal	37
13	Protocole expérimental de l'extraction des polyphénols	38
14	Principe de fonctionnement d'une chaîne HPLC	41
15	Répartition des prélèvements selon leur provenance.	44
16	Distribution des prélèvements positifs selon leur nature	45
17	Aspect macroscopique d' <i>E.coli</i> sur GN et Hektoen.	46
18	Aspect macroscopique de <i>Citrobacter koseri</i> sur GN et Hektoen.	46

19	Aspect macroscopique de <i>Klebsella pneumoniae</i> sur milieu GN et Hektoen.	47
20	La coloration de Gram d' <i>Escherichia coli</i> (G100X)	47
21	Exemple de lecture de la microgalérie API 20 ^E d' <i>E. cloacae</i> .	48
22	Fréquence des entérobactéries identifiées.	49
23	Répartition de l'ensemble des souches d'entérobactéries BLSE positif identifiées.	50
24	Répartition des souches d'entérobactéries BLSE positif selon le sexe.	51
25	Répartition des souches d'entérobactéries BLSE positif selon l'âge des patients	52
26	Répartition des espèces selon la nature de prélèvement	53
27	Résultats de la Résistance/Sensibilité des 62 souches BLSE aux antibiotiques testés	54
28	Etude de la Résistance/Sensibilité des 20 souches BLSE aux antibiotiques testés	54
29	Rendement d'extraction des extraits phénoliques.	58
30	Droite d'étalonnage de l'acide gallique (moyenne \pm SD de trois essais).	59
31	la teneur en polyphénols des extraits du de <i>Punica granatum</i> .	59
32	Chromatogrammes de l'analyse HPLC des extraits du fruit <i>Punica granatum</i>	62
33	Diamètre des zones d'inhibition de la croissance bactérienne obtenue en présence des différents extraits.	64
34	Diamètre des zones d'inhibition de la croissance bactérienne des souches <i>E.coli</i> (a) <i>K.pneumoniae</i> (b) <i>E.cloacea</i> et les autres espèces (c) obtenus en présence des différents extraits.	67
35	Quelques résultats de l'effet antibactérien des extraits de la peau du fruit <i>Punica granatum</i> .	69
36	Quelques zones d'inhibition de quelques souches (Aromatogramme).	Annexe III
37	Fiche des renseignements	Annexe III
38	la galerie classique utilisée au cour de diagnostic.	Annexe II

39	les réactifs de coloration de Gram	Annexe II
40	Résultats du dosage des polyphénols	Annexe III
41	<i>Escherichia coli</i> productrice de BLSE : Test du double disque positif	Annexe III
42	Exemple de lecture de la microgalérie API 20 ^E de quelques souches.	Annexe III

Résumé :

Les antibiotiques représente la classe thérapeutique la plus largement prescrite, parmi ceux-ci les β -lactamines qui constituent la famille la plus fréquemment utilisée pour leur large spectre antibactérien mais malheureusement, l'usage irrationnel de ces antibiotiques a favorisé la persistance et l'émergence des bactéries pathogènes résistantes sécrétrices de β -lactamases à spectre étendu (Entérobactéries) (E-BLSE). Cette émergence est devenue aujourd'hui un problème de santé publique. L'objectif de notre étude était de rechercher en premier lieu les composés phénoliques présents dans les extraits organiques et aqueux de la peau de la grenade (*Punica granatumL.*) et évaluer en deuxième lieu *in vitro* l'activité antibactérienne de ces extraits. Les dosages des polyphénols totaux par la méthode de Folin-Ciocalteu et l'analyse HPLC qualitative ont révélé la richesse de la peau de grenade en polyphénols avec une teneur varie de 76,625 à 275,062 mg EAG/100g de grenade tous dépend de la polarité de solvant et du mode d'extraction. Les classes identifiées dans nos extraits sont des acides phénoliques et des flavonoïdes. L'expression des résultats de l'activité antibactérienne a montré que toutes les souches bactériennes testées sont inhibées au moins par l'un des extraits, ce qui confirme le spectre large de l'activité antibactérienne de la peau de ce fruit et que l'extrait éthanolique était le plus actif.

Mots clés : *Punica granatum*, Entérobactéries productrices de β -Lactamase à Spectre Elargi, Polyphénols, Activité antibactérienne, Multi-résistance.

الملخص

تمثل المضادات الحيوية الفئة العلاجية التي توصف على نطاق واسع و,منها بيطالاکتامين و هي العائلة الأكثر استخداما لطيفها الواسع ضد الجراثيم ,ولكن للأسف الاستعمال الغير العقلاني لهذه المضادات عزز ظهور وانتشار البكتريا المعويه المسببة للأمراض المفترزة للبيطالاکتياز واسع النطاق متعددة المقاومة ,حيث أصبح هذا الظهور مشكله صحيه عامه , والهدف من دراستنا اولا البحث عن المركبات الفينولية الموجودة ف المستخلصات العضويه والمائيه للقشر الرمان اما ثانيا تقييم نشاط المضاد الحيوي للمستخلص فالمختبر ومن هذا التقييم النوعي لثراء محتوى القشر ب اش ب ال سي و الفولين سيوكالتو , حيث كشفت ثراء القشر ب البوليفينول يتراوح بين 275,062-76,625 ملغ من البوليفينول مساوي لحمض الكاليك ف 100 غرام وكل هذا يتوقف على قطبية المذيبات وطريقة الاستخلاص,الفئات المحددة ف مستخلصاتنا هي الاحماض الفينوليه والفلافونويد تحليل نتائج نشاط المضاد الحيوي يبين ان السلالات البكتريه المختبره تم اثباطها علي الاقل بنوع من المستخلصات مما يبرهن النطاق الواسع لنشاط المضاد الحيوي الموجود في قشرة الرمان حيث كان المستخلص الإيثانولي الاكثر نشاطا

كلمات البحث: الرمان، المعوية المنتجة للبيتا لاكتاماز الطيف الموسع، بوليفينول، والنشاط المضاد للبكتيريا، متعددة

المقاومة.

Abstract:

Antibiotics therapeutic class represents the most widely prescribed, among them the β -lactam antibiotics which are family the most frequently used for their broad spectrum antibacterial but unfortunately, the irrational use of these antibiotics has contributed the persistence and the emergence of resistant pathogenic bacteria secreting extended spectrum β -lactamases (Enterobacteria) (E-ESBL). This emergence has become a public health problem today. The aim of our study was to first look for the phenolic compounds present in the organic and aqueous extracts of pomegranate (*Punica granatumL.*) skin and secondly to evaluate in vitro the antibacterial activity of these extracts. The total polyphenol assays by the Folin-Ciocalteu method and the qualitative HPLC analysis revealed the richness of pomegranate skin in polyphenols with a content varies from 76.625 to 275.062 mg EAG / 100g of pomegranate all depends on the polarity of solvent and the extraction mode. The classes identified in our extracts are phenolic acids and flavonoids. The expression of the results of the antibacterial activity showed that at least one of the extracts inhibits all the bacterial strains tested, which confirms the broad spectrum of the antibacterial activity of the skin of this fruit and that the Ethanolic extract was the most active.

Key words: *Punica granatumL.*, Enterobacteria producing broad-spectrum β -lactamase, Polyphenols, Antibacterial activity, Multi-resistance.

Introduction

Nombreux documents historiques témoignent comment les bienfaits des aliments ont été pris en compte depuis plus de mille ans et même Hippocrate, considéré comme "le père" de la médecine occidentale, disait «Permettez à vos aliments d'être votre médicament, et à votre médicament d'être vos aliments».

Dans ce contexte, au cours des dernières décennies, les recherches scientifiques n'ont fait que confirmer les effets sanitaires bénéfiques des fruits, des légumes et des plantes en général. Ces dernières sont douées d'un très large éventail d'activités biologiques grâce à leur métabolites secondaires actifs telle que les composés phénoliques, les alcaloïdes, les huiles essentiels, qui ont l'avantage d'être d'une grande diversité de structure chimique (**Zeghad, 2009**).

De nos jours, les propriétés des polyphénols sont largement étudiées dans le domaine médical où on leur reconnaît des activités antimicrobienne, antivirales, anti-tumorales, anti-inflammatoires et antiallergiques (**Miguel et al., 2010**).

Malgré la nature hétérogène d'une biodiversité immense du continent africain en général et de l'Algérie en particulier, il y a eu peu d'efforts consacrés au développement des agents thérapeutiques des variétés Algériennes. Parmi les plantes médicinales ayant un intérêt thérapeutique important figure le grenadier (*Punica granatum L.*). Il est très fréquemment consommé et employé en médecine traditionnelle en Algérie. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à étudier l'activité antibactérienne des extraits phénoliques de l'écorce de ce fruit.

Plusieurs études ont montré la capacité des polyphénols de grenadier à retarder ou à empêcher la croissance d'une gamme de bactéries et des champignons y compris les bactéries pathogènes pour l'homme (**Alsaimary et, 2014 ; Sajjad et al., 2015 ; Alka and Siddarth, 2017**). Ceci nous a amené à essayer de confirmer ou d'infirmer les hypothèses des populations rurales algériennes qui suggèrent l'efficacité de l'écorce du fruit (*punica granatum L.*) contre les maladies infectieuses, par une étude scientifique sur la variété Algérienne « doux de kolea »

A présent, l'augmentation critique de l'antibiorésistance à plusieurs antibiotiques incite à trouver de nouvelle stratégie thérapeutique pour diminuer le taux d'infection microbienne qui peut être un souci et problème de santé publique.

Dans cette optique, cette étude vise deux objectifs principaux :

- ✓ D'une part, d'isoler, identifier une collection de bactéries multirésistantes (entérobactéries BLSE) impliquées dans des pathologies diverses, issues de différents sites de prélèvements, et d'évaluer leur profil de résistance vis-à-vis des antibiotiques.
- ✓ D'autre part, d'étudier *in vitro* l'effet antibactérien des extraits naturels (aqueux, méthanoliques et éthanolique) de l'écorce *Punica granatum* vis-à-vis de ces souches multirésistantes et faire une comparaison entre leur l'effet antibactérien et celui des antibiotiques testés.

Donc, notre étude englobe deux aspects, dont le premier est d'ordre phytochimique basé principalement sur l'extraction des composés phénoliques. Le second aspect est d'ordre biologique consacré à l'évaluation de l'activité antibactérienne de ces extraits par la méthode de diffusion en milieu solide.

1. Objectifs

Notre travail vise à rechercher des constituants chimiques « **les polyphénols** » et d'évaluer *in vitro* l'activité antibactérienne des extraits organiques et de l'extrait aqueux, préparés à partir de la peau du fruit *Punica granatum* vis-à-vis des souches d'entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre étendu, pour cela nous avons fixé les objectifs suivants :

- ✓ Isoler, purifier et identifier les souches d'entérobactéries à partir de différents types de prélèvements.
- ✓ Etudier leurs sensibilités *vis-à-vis* de différents antibiotiques.
- ✓ la recherche du mécanisme de la résistance par un test de détection des enzymes β -lactamases à spectre étendu.
- ✓ Extraction et dosage des polyphénols des différents extraits préparés.
- ✓ Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits par la méthode de diffusion en milieu solide).

2. Le lieu de travail

Notre étude a été effectuée au niveau :

- Du laboratoire central de l'hôpital **P'EH S EL HADI FLICI (El kettar)** à Alger pour la collection des entérobactéries BLSE. Durant une période du 18 février au 14 juin 2018.
- Au niveau du Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico-chimiques (**CRAPC**) de Bou-ismail pour l'extraction des polyphénols. Durant la période du 07 Mai au 20 Juin 2018.
- Laboratoire **PFE** (Projet de fin d'étude) pour le dosage des polyphénols.

3- Matériel et Méthodes

3-1- Matériel

3-1-1- Matériel non biologique

Le matériel non biologique est représenté par : la verrerie, l'appareillage, les colorants et les réactifs, les milieux de culture ainsi que les disques d'antibiotiques utilisés (**voir AnnexeI**).

3-1-2- Matériel biologique

- **20 souches d'enterobacteries BLSE** isolées à partir de pus, LCR et des urines provenant de différents services pour des patients hospitalisés au sein de l'hôpital de

l'EHHS EL HADI FLICI (El kettar) d'Alger et des hôpitaux limitrophe et aussi à des malades consultants à titre externe.

- **Souches de références :** *E.coli* ATCC 25922 sensible à tous les antibiotiques qui sont dans le spectre des Bacille à Gram Négative (BGN).

3-1-3- Matériel végétal

Cette étude a été réalisée sur la peau de fruit *Punica granatum*L. Récoltée au niveau du jardin à SOUMAA (région de Blida, Algérie) durant le mois d'octobre 2017.



Figure 08 : Représentation de la variété grenade utilisée dans notre étude (**Originale, 2017**).

3.2- Méthodes

3.2.1- Isolement et identification des germes pathogènes

Durant notre période de stage, 2487 prélèvements (1189 urines, 280 pus et 1018 LCR) ont été reçus au niveau du laboratoire, appartenant à des patients externes et internes provenant de différents services.

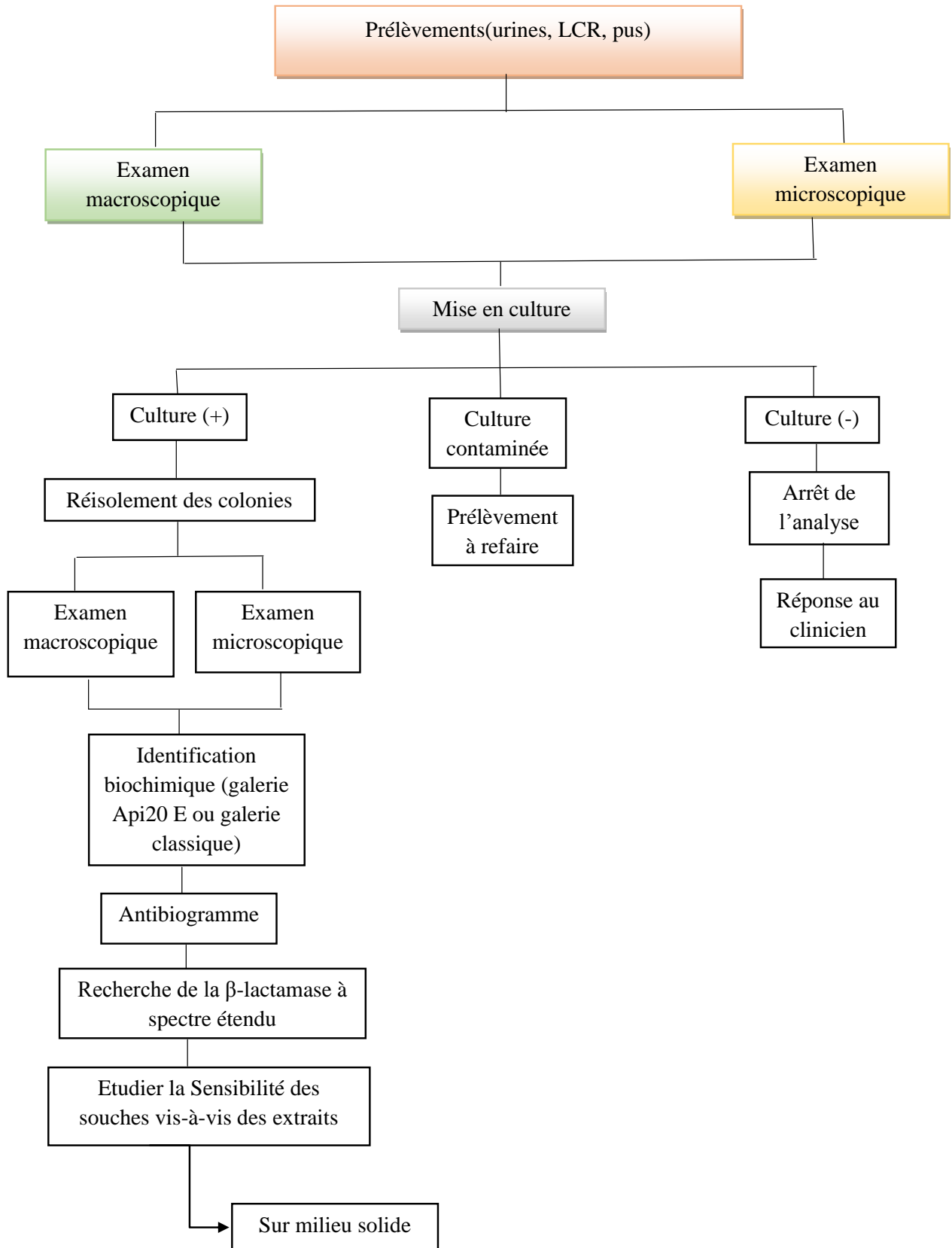


Figure 09 : Protocole expérimental pour l'évaluation de l'activité antibactérienne.

Les prélèvements reçus au laboratoire sont accompagnés d'une fiche de renseignement (**Annexe III**) qui comporte :

- o Nom et prénom.
- o Age et sexe.
- o Service d'hospitalisation.
- o Nature de prélèvements.
- o Antibiothérapie en cours.

3.2.1.1- Techniques de prélèvement

La réalisation d'un prélèvement dans les meilleures conditions d'asepsie est d'une importance primordiale, car la qualité de l'échantillon conditionne la valeur des résultats (**Annexe II**).

3.2.1.2- Méthodologie de diagnostic

Les milieux utilisés et l'interprétation des résultats dépendent de la nature du prélèvement à analyser.

a) Étude cytot bactériologique des urines

✚ Examen macroscopique

- o L'aspect des urines : l'urine normale est claire. Un aspect trouble peut être dû à une infection urinaire mais aussi à la présence de cristaux ou de sels amorphes (**Djennane et al., 2009**).
- o La couleur : jaune paille, ambrée, ictérique, hématurique, éventuellement colorée par des médicaments (bleu de méthylène, rifampicine...etc.).
- o L'hématurie peut être macroscopique ou microscopique selon son intensité.

✚ Examen microscopique

A l'état normal, l'urine est très pauvre en éléments cellulaires : environ 10³ hématies et moins de 10⁴ leucocytes /ml, des cellules de desquamation de la muqueuse, des cylindres hyalins ainsi que des cristaux (**Darbas et al., 2007**).

L'examen microscopique en bactériologie peut être effectué sans coloration de l'échantillon par observation directe entre lame et lamelle (technique de l'état frais) (**Denis et al., 2012**).

Cet examen doit être effectué dans les deux heures qui suivent le prélèvement afin de limiter l'altération des éléments cellulaires (Djennane et al., 2009).

- L'état frais : c'est un examen qui se fait entre lame et lamelle sur cellule hématimétrique ou sur cellule normale ; il présente de ce fait un double intérêt :
 - Quantitatif : Numération des éléments cellulaires.
 - Qualitatif : Description des différents éléments cellulaires (Djennane et al., 2009).
- **Technique**
 - ❖ Déposer une goutte d'urine non diluée sur la lame à l'aide d'une pipette Pasteur débouchée.
 - ❖ Recouvrir de lamelle couvre-objet propre en évitant d'enfermer des bulles d'air.
 - ❖ Le liquide ne doit pas déborder (sinon jeter la lame dans une solution désinfectante et recommencer).

Observer au microscope à l'objectif 40x.


➤ **Lecture**

En cas d'infection urinaire, le processus inflammatoire se traduit le plus souvent par la présence de :

- $> 5 \times 10^4$ leucocytes /ml.
- $> 10^4$ hématies /ml.

 **La mise en culture**

La réalisation d'une culture est nécessaire pour le diagnostic de l'infection urinaire, elle permet de préciser l'espèce bactérienne, quantifier la bactériurie et effectuer un antibiogramme. Une anse calibrée à 10 µl est utilisée pour ensemercer les géloses nutritives. On prélève verticalement avec l'anse calibrée et par capillarité une goutte d'urine que l'on ensemece par stries sur la boîte de gélose : une strie centrale est ensemençée puis perpendiculairement réaliser un isolement de haut en bas de la boîte en desserrant légèrement les dernières stries (Djennane et al., 2009).

 **Incubation et dénombrement**

Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 18h à 24h. Après l'incubation, Chaque colonie isolée correspond à une concentration de 10^3 Unités viables/ml urine. La numération bactérienne est comparée à l'abaque de lecture correspondant aux différentes concentrations de bactéries/ml d'urines (Djennane et al., 2009).

L'interprétation s'effectue de la manière suivante pour confirmer la présence ou l'absence d'infection urinaire :

- Bactériurie $< 10^3$ UFC / ml : absence d'infection urinaire.
- Bactériurie $> 10^5$ UFC/ ml : présence d'infection urinaire.
- Entre 10^3 et 10^4 UFC / ml : zone d'incertitude (valeurs à contrôler si besoin).

b) Étude cytotobactériologique du LCR

L'examen du LCR permet le diagnostic de méningite aiguë. Il est réalisé en urgence lorsqu'une méningite est suspectée. Il peut être également nécessaire au diagnostic d'autres infections du système nerveux central : méningo-encéphalites, abcès cérébraux, myélites.

Après un examen macroscopique, numération sur cellule de Malassez et un frottis coloré pour les LCR à cytologie positive, on prélève un volume qu'on ensemence sur une gélose au sang cuit, les boîtes sont incubées dans une atmosphère enrichie de 5% à 10% de CO_2 à 35°C pendant 24H à 48H, un isolement sur une gélose Hektoen pour les bacilles à Gram négatif oxydatif est réalisé (**Annexe II**).

c) Étude cytotobactériologique du pus

L'écouvillon dont nous avons prélevé avec a été déchargé par stries serrées sur boîtes suivantes : une gélose au sang cuit (GSC), une gélose au sang frais (GSF) et une gélose Hektoen, puis nous avons réensemencé par une pipette Pasteur toute la surface de la gélose aussi par des stries serrées, tout en réalisant un enrichissement dans un bouillon coeur-cerveau (B.H.I.B).

Après l'incubation, et à partir du bouillon d'enrichissement les mêmes milieux ont été ensemencés si la culture dans les boîtes d'origine été négative. L'incubation est faite à 37°C pendant 24h à 48h, les boîtes de GSC et GSF sont incubées dans une atmosphère enrichie de 5% à 10% de CO_2 .

3.2.1.3- Identification

3.2.1.3.1. Etude morphologique

La morphologie des microorganismes est investiguée suivant deux examens, un examen macroscopique ; présentant certains critères culturels observables à l'œil nu, et un examen microscopique ; visant la détermination de la mobilité à l'état frais, la forme, le mode d'arrangement et le groupe bactérien (Gram+/Gram-) après une coloration permettant

d'observer des bactéries tuées fixées sur une lame traitée par au moins un seul colorant, la plus adaptée est celle de Gram (Voir principe et technique de la coloration de Gram en **Annexe II**).

3.2.1.3.2. Identification biochimique

L'identification biochimique repose sur l'utilisation de galeries spécifiques qui permettent d'identifier le genre et l'espèce bactérienne en s'appuyant sur ces caractères biochimiques après orientation à partir de caractères cultureux et morphologiques.

Galerie Api 20E

Après la coloration de Gram les souches sont par les galeries biochimiques API 20E (Analytical Profile Index)

➤ **Principe**

D'après **Frenay et al., (2007)**, la galerie **API 20E** comporte 20 microtubes contenant des substances déshydratés. Au-dessous de chaque tube, un sigle indique la nature du test. Les tubes sontensemencés avec une suspension bactérienne effectuée en eau distillée stérile. La réaction produite au cours du procédé d'incubation se traduit par les virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactif.

Un fond et couvercle complètent la galerie et permettent de constituer une boîte d'incubation.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide d'un tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide de la base de données API 20E (Bio-Mérieux).

➤ **Technique**

• **Préparation de la galerie**

- On place de l'eau distillée dans les alvéoles présentes dans le fond de la boîte afin de créer une atmosphère humide.
- On dépose aseptiquement la galerie dans la boîte d'incubation.

• **Préparation de l'inoculum**

On prélève à l'aide d'une pipette pasteur boutonnée une colonie suspecte parfaitement isolée puis la dissocie soigneusement dans le tube contenant préalablement l'eau distillée stérile.

• **Inoculation de la galerie**

- ❖ Remplir les tubes et cupules des tests CIT, VP et GEL avec la suspension bactérienne et uniquement les tubes des autres tests.

- ❖ Réaliser une anaérobiose dans les tests ADH, LDC, ODC, H₂S, URE en remplissant leur cupule d'huile de vaseline stérile.
- ❖ Refermer la galerie et l'incuber à 37°C pendant 18 à 24 heures.
- ❖ Après incubation, noter sur la fiche de résultat, toutes les réactions spontanées. La révélation des trois TDA, VP et indole est faite par l'ajout des réactifs nécessaires (TDA, VP1, VP2 et KOVACS).

➤ **Lecture**

La lecture des galeries API 20E se fait selon les indications du fournisseur. Après codification des réactions en un profil numérique :

- les tests seront regrouper en groupe de 3 prennent les chiffres (1,2ou 4) pour un test positive et le chiffre 0 pour un test négative.
- On obtient un nombre de 7 chiffres (profil numérique). L'identification est alors obtenue en comparant avec le catalogue analytique.

3.2.1.3.3. MALDI-TOF- MS (Matrix-Assisted Laser Desorption and Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry method)

➤ **Principe**

L'identification des micro-organismes reposait jusqu'à présent sur l'étude des caractères cultureux et biochimiques des espèces bactériennes et fongiques. Depuis quelques années, la spectrométrie de masse de type Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight (MALDI-TOF) s'est développée dans les laboratoires de microbiologie clinique. Cette nouvelle technologie permet de réaliser très rapidement et à moindre coût un diagnostic d'espèce sur des colonies de bactéries ou de champignons isolés sur des milieux de culture solides. Par ailleurs, il est aussi possible d'identifier les germes directement à partir de flacons d'hémocultures positifs ou à partir de certains prélèvements comme les urines (**Suarez et al., 2015**).

La spectrométrie de masse est une technique d'identification des bactéries basée sur l'analyse de leurs protéines totales à partir de colonies isolées (**Seng et al., 2010**). De façon succincte, le spectromètre est composé de trois éléments principaux : une chambre d'ionisation produisant des ions en phase gazeuse, un analyseur séparant les ions selon le rapport masse sur charge (m/z) et un détecteur transformant le courant ionique en courant électrique et générant un spectre de masse caractérisant l'échantillon. Le spectre obtenu est ensuite comparé à une

collection de spectres contenus dans des bases de données de façon à identifier la souche bactérienne.

Les résultats d'identification des bactéries sont donnés, par un score entre 0 à 3 (**Tableau I**). L'identification d'un germe est validée lorsque le score est supérieur à 1,9.

Tableau I : Score d'identification bactérienne dans le système Microflex LT (**Bruker Daltonics**).

Range	Description	Symbols	Color
2.300 ... 3.000	highly probable species identification	(+ + +)	green
2.000 ... 2.299	secure genus identification, probable species identification	(+ +)	green
1.700 ... 1.999	probable genus identification	(+)	yellow
0.000 ... 1.699	not reliable identification	(-)	red

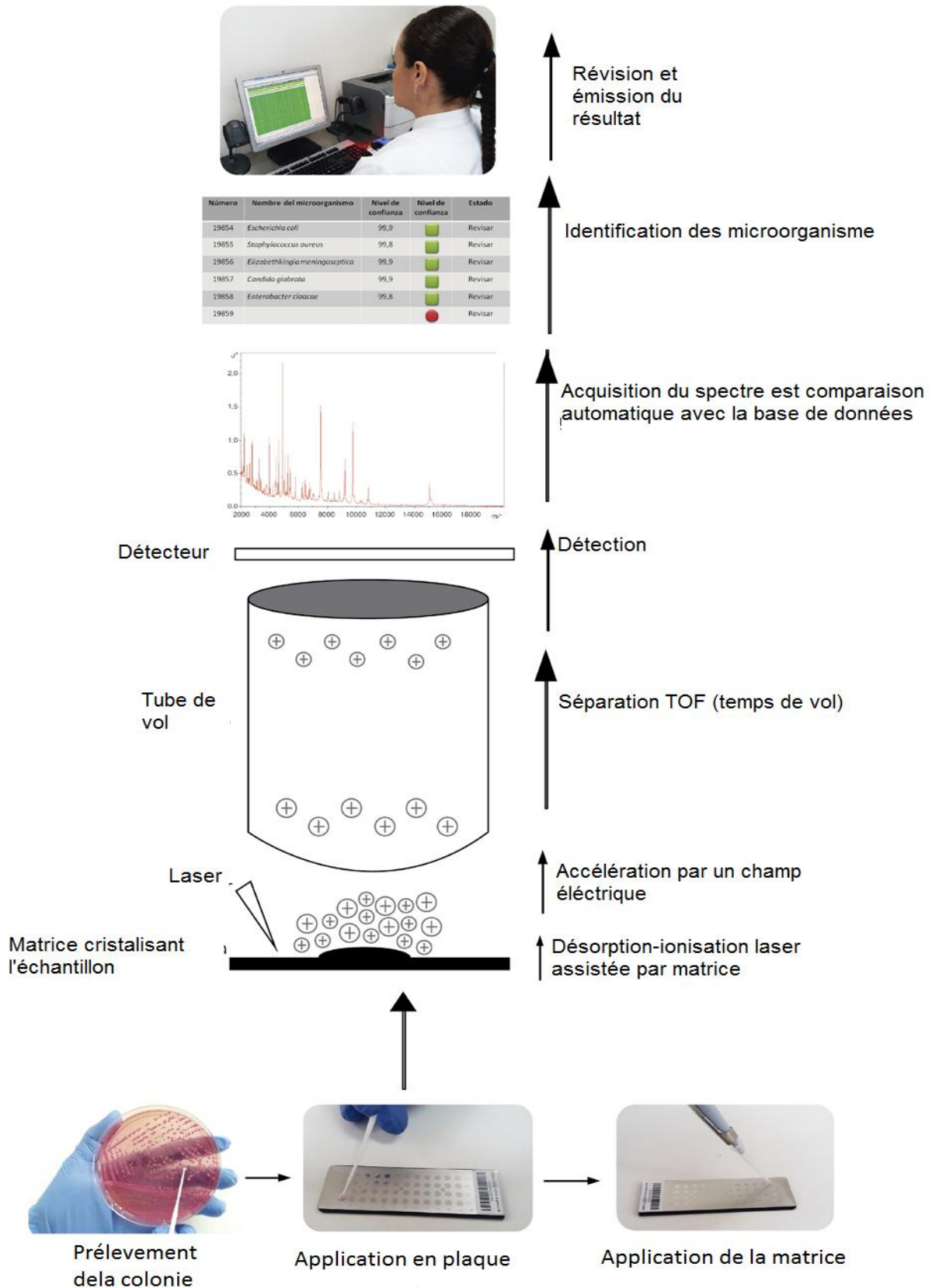


Figure 10 : Principe de la technique MALDI-TOF-MS

➤ **Technique**

• **Nettoyage de la plaque-cible**

Consiste à rincer la plaque avec de l'eau chaude, et à verser de l'éthanol à 70% que l'on frotte avec du papier. Ensuite, on plonge la cible dans l'éthanol pendant 15 min, puis on la frotte avec 500µL de TFA (Acide TriFluoroacétique) à 80% et enfin on la rince avec de l'eau utilisée pour l'HPLC (High-performance liquid chromatography) et on la laisse sécher à l'air libre.

• **Préparation des échantillons pour analyse spectrométrique**

Sous un PSM (poste de sécurité microbiologique), on prélève les bactéries à identifier, à partir d'une culture bactérienne de 24 heures, pour les déposer sous forme d'un fin frottis d'environ 5 mm², sur les spots de la plaque métallique servant de cible aux tris du laser. Pour chaque souche, on fait 4 spots pour réduire le risque d'erreur.

- ❖ On dépose 2µL de matrice sur chaque spot.
- ❖ On laisse sécher sous la hotte pendant 15 minutes pour permettre sa co-cristallisation avec l'échantillon bactérien.

• **Insertion de la cible et lancement du MALDI TOF**

- ❖ La cible était ensuite introduite dans l'appareillage (Microflex, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) et exposée sous-vide, aux tris du laser.
- ❖ Remplir la fiche du logiciel MALDI Biotyper Automation Control.
- ❖ Lancer le spectromètre de masse.

• **Interprétation des résultats de l'analyse spectrométrique :**

MALDI TOF identifie les micro-organismes en utilisant le logiciel Biotyper 2.0. La spectrométrie de masse permet de mesurer une unique empreinte moléculaire d'un organisme, plus précisément, le logiciel Biotyper MALDI mesure les protéines très abondantes qui se trouvent dans tous les micro-organismes.

Les motifs caractéristiques de ces protéines très abondantes sont utilisés pour identifier d'une manière fiable et précise un micro-organisme particulier, en faisant correspondre le modèle respectif à une base de donnée étendue ouverte, pour déterminer l'identité du micro-organisme jusqu'au niveau d'espèce. L'identification est correcte lorsque la valeur du score identifiée par le MALDI-TOF est ≥ 1.9 (Suarez et al., 2015) (Tableau II).

3.2.1.4. Étude de la sensibilité des souches d'entérobactéries aux antibiotiques

Le but de la réalisation d'un antibiogramme est de prédire la sensibilité d'un germe à un ou plusieurs antibiotiques dans une optique essentiellement thérapeutique (**Burnichon et texier, 2003**).

On a suivi les recommandations du réseau national de Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale (médecine humaine et vétérinaire) dans sa 6^{ème} édition (**AARN, 2011**).

Tableau II : Liste des Antibiotiques utilisés dans le cadre de notre étude.

Antibiotiques	Abréviations	Charge (µg)	Famille
Amoxicilline + Acide clavulanique	AMC	20+10	β-lactamines
Céfotaxime	CTX	30	
ceftriaxone	CRO	30	
Aztréonam	ATM	30	
Ceftazidime	CAZ	30	
Céfoxitine	FOX	30	
Imipénème	IPM	10	
Céfazoline	CZ	30	
Acide nalidixique	NAL	30	
Ofloxacin	OFX	5	
Ciprofloxacine	CIP	5	
Gentamicine	GEN	10	Aminosides
Amikacine	AMK	30	
Triméthoprim- sulfaméthoxazole	SXT	25	Sulfamides

➤ **Préparation de l'inoculum**

- ❖ A partir d'une culture pure de 18 à 24h sur milieu d'isolement approprié, racler à l'aide d'une pipette pasteur quelques colonies bien isolées parfaitement identiques.
- ❖ Bien décharger la pipette dans 5 à 10 ml d'eau physiologie stérile à 0.9%.
- ❖ Bien homogénéiser la suspension bactérienne à l'aide d'un votrex, son opacité doit être équivalente à 0.5 Mc Farland.
- ❖ L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique s'il est trop fort.
- ❖ L'ensemencement doit se faire dans les 15 min qui suivent la préparation de l'inoculum.

L'ensemencement est réalisé par la méthode d'écouvillonnage

- ❖ Tremper l'écouvillon stérile dans la suspension bactérienne.
- ❖ L'essorer en le pressant fermement (en le tournant) sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum.
- ❖ Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface, de haut en bas, en stries serrées.
- ❖ Répéter l'opération trois fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

Dans le cas où l'on ensemence plusieurs boîtes de Pétri, il faut recharger l'écouvillon à chaque fois.

➤ **Application des disques d'antibiotiques**

Il est préférable de ne pas mettre plus de 6 disques d'antibiotiques sur une boîte de 90mm de diamètre. Les disques d'antibiotiques doivent être espacés de 24mm, centre à centre. Presser chaque disque d'antibiotique à l'aide de pinces bactériologique stériles pour s'assurer de son application. Une fois appliqué, le disque ne doit pas être déplacé. Incuber 18 heures à 37°C.

➤ **Lecture**

Mesurer avec précision, les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse métallique, à l'extérieur de la boîte fermée.

3.2.1.5-Recherche phénotypique de la production des BLSE

Selon les recommandations du **CLSI, (2014)**, la recherche de la BLSE pour l'interprétation de la sensibilité des entérobactéries aux céphalosporines n'est plus obligatoire.

La détection phénotypique de la BLSE garde tout son intérêt dans les études épidémiologiques et en hygiène hospitalière.

On recherchera une BLSE devant un diamètre inférieur aux valeurs suivantes :

- Céfotaxime (CTX a 27mm).
- Ceftazidime (CAZ a 22mm).
- Ceftriaxone (CRO a 25mm).
- Aztréonam (ATM a 27mm).

A- Test de synergie

La recherche de la BLSE se fait dans les conditions standards de l'antibiogramme en déposant un disque d'amoxicilline + acide clavulanique (AMC 20/10µg) a 30mm centre a centre d'un disque de C3G (Céfotaxime : CTX 30µg ou Ceftriaxone : CRO 30µg). Incuber 18H à 35°C.

Cette technique permet la mise en évidence des TEM et SHV. Pour les autres BLSE de classe A (CTX-M, CMT, ...) le test de synergie doit être fait dans les mêmes conditions standards de l'antibiogramme en déposant un disque d'AMC a 30mm centre a centre d'un disque de : CAZ, CTX ou CRO et ATM en raison de l'existence de phénotypes de résistance différents (céfotaximase ou ceftazidimase ...).

➤ Lecture

La production d'enzyme peut se traduire par l'apparition d'une image de synergie ou bouchon de champagne entre les disques :

- AMC et CTX
- AMC et CAZ
- AMC et ATM.

En l'absence d'une image de synergie, la production de BLSE sera suspectée devant toute diminution du diamètre autour des disques de C3G.

Elle peut être due à :

- 1) La synthèse d'une BLSE de type CMT (Complexe Mutants TEM)
- 2) L'association de plusieurs mécanismes : BLSE + Case hyperproduite (entérobactérie).
- 3) La recherche de CMT : se fera en rapprochant les disques CTX- AMC de 20mm et 25mm au lieu de 30mm.
- 4) La détection des BLSE chez les souches hyper productrices de Case est facilitée par :
 - La recherche d'une synergie entre AMC et céfépime (CFP 30µg) ou cefpirome (CPO 30µg SFM), car ce sont des molécules stables à l'action de la Case hyperproduite (recommandations du CA-SFM-2011).

B- Test de confirmation ou technique du double disque TDD

Ce test devra être fait systématiquement devant :

- L'absence de synergie avec diminution des diamètres des C3G.
- La présence d'une résistance aux molécules suivantes : ampicilline, ticarcilline, céfazoline avec un diamètre < 6mm, par contre l'AMC présente un diamètre d'inhibition.

➤ **Technique**

Ce test se fait dans les conditions standards de l'antibiogramme.

Appliquer les disques d'antibiotiques :

➤ **Pour les entérobactéries**

- ❖ Déposer un disque d'AMC et un disque de C3G (CTX ou CRO) a une distance de 30mm (Centre a centre).
- ❖ Laisser diffuser les antibiotiques pendant une heure, a la température ambiante (sur la paillasse), la boite sera déposée couvercle vers le haut.
- ❖ Après 1H d'incubation, ôter le disque d'AMC et le remplacer par un disque de CTX ou CRO (ou CAZ).
- ❖ Incuber la boite 18 H à 35°C.

➤ **Lecture et interprétation**

Le test du double disque est positif quand le diamètre d'inhibition autour du C3G, applique après diffusion du disque AMC est ≥ 5 mm par rapport au diamètre d'inhibition autour du disque de C3G (**Annexe III**).

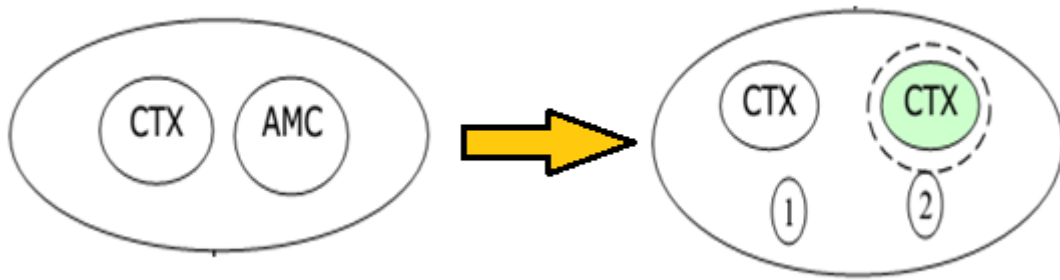


Figure 11 : Schéma de détection de BLSE par le test du double disque.

➤ **Contrôle de qualité**

Les mêmes techniques seront réalisées en parallèle pour les souches :

- *E. coli* ATCC 25922 non productrice de BLSE.

3.2.1.6. Extraction des composés phénoliques

Une fois récoltée, la peau de *Punica granatum L.* a été pelée manuellement et séchée à l'air libre dans un espace obscurité à température ambiante pendant 6 mois, puis transférés dans l'étuve à 40 °C pendant 24 heures pour affiner le séchage et pour obtenir un meilleur broyage et meilleur extraction. Après séchage, la peau du fruit est broyé à l'aide d'un broyeur électrique jusqu'à l'obtention d'une poudre fine. Les particules ainsi obtenues sont tamisées sur un tamis de diamètres 100 µm pour avoir une poudre homogène. La poudre obtenue est conservée dans un récipient et stocké à l'abri de lumière et de l'humidité jusqu'à l'extraction (**figure 12**).



Figure 12 : Préparation du matériel végétal (originale, 2018).

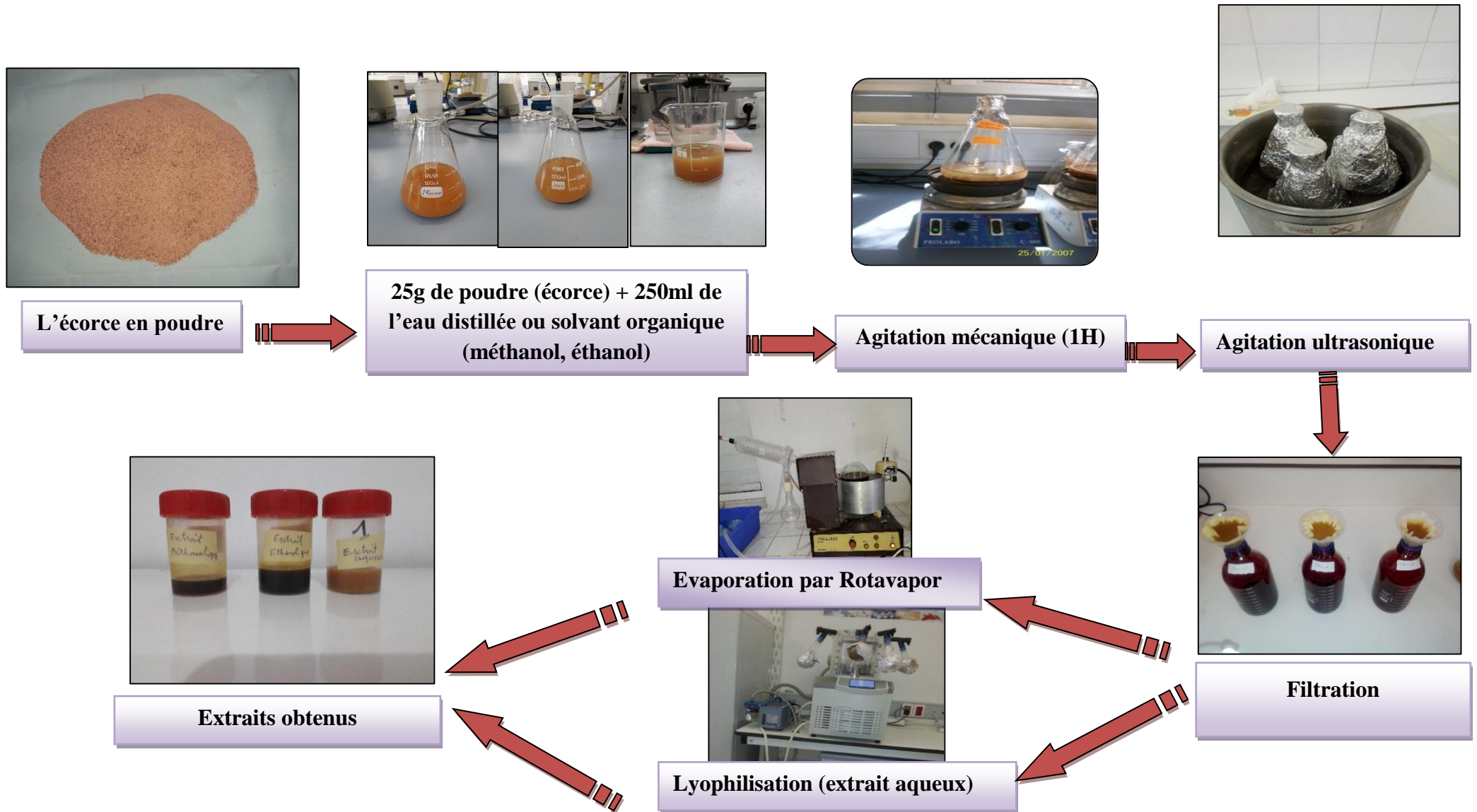


Figure 13 : Protocole expérimental de l'extraction des polyphénols

L'objectif de cette extraction est de libérer et d'extraire le maximum de molécules polyphénoliques présentes dans des structures vacuolaires par rupture du tissu végétal et par diffusion en utilisant un bain ultrasonique qui accélère et augmente le rendement d'extraction.

On a utilisé la méthode de (Chebaibi et Filali, 2013 ; Debib et al., 2014) avec modifications. 25g de matériel végétal broyées de manière à ce que la surface de contact avec le solvant (Eau distillée/ Méthanol ou Ethanol) soit la plus grande possible et donc le rendement d'extraction soit le meilleur possible sans que le temps d'extraction soit trop long, puis été macéré dans 250 ml du solvant et subi une agitation mécanique pendant 1 heure suivit d'une extraction dans un bain ultrasonique de marque « **FRITSCH** », pendant 2 heures . Les solutions ont été ensuite filtrées sur un papier filtre pour séparer le filtrat du marc. Celle-ci était réextraite avec 100 ml du solvant selon le même protocole pendant 1 heure. Finalement 50 ml pendant 30 mn, les trois fractions d'extraction ont été combinées dans un volume final de 400 ml .Le solvant a été évaporé (le méthanol et l'éthanol) par évaporation au rotavapeur à la température de 50°C ou déshydraté dans un lyophilisateur (48h à 72h). Les extraits obtenus ont été conservés à 4°C avant leur utilisation.

➤ **Calcul du rendement**

Le rendement est la quantité d'extrait obtenue à partir de la poudre végétale. Il est exprimé en pourcentage ou est sans unité. En pratique, on a fait le rapport de la masse de l'extrait sur la masse de la poudre végétale qui a servi pour l'extraction qu'on a multiplié par 100. Ceci se traduit par la formule donnée par **Harbone, (1980)**.

$$R = \frac{\text{Masse d'extrait obtenue}}{\text{Prise d'essais}} \times 100$$

3.2.1.7. Dosage des polyphénols par colorimétrie

Les polyphénols sont estimés par la méthode de Folin-Ciocalteu décrite dès 1965 par Singleton et Rossi. Et modifiée ensuite par plusieurs auteurs (**Singleton et al., 1999**).

➤ **Principe**

Les composés phénoliques réagissent avec le réactif de Follin-ciocalteu. Ce dernier est composé d'un mélange jaune d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PM_{12}O_{40}$) qui se réduit lors de l'oxydation des polyphénols, en oxyde bleu de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (MO_8O_{23}). La coloration produite, dont l'absorption maximum est comprise entre 725 et 765nm est proportionnelle aux taux des composés phénoliques (**Ribereau-Gayon et al., 1982**).

➤ **Technique**

1000 μL de réactif de Folin-Ciocalteu (dilué 10 fois dans de l'eau ultra pure) sont ajoutés à 200 μL d'extrait. On ajoute ensuite 800 μL de Na_2CO_3 (75g.L-1). Le blanc de la réaction ne contenant pas de polyphénols est réalisé comme le point 0 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ de la gamme d'étalon. Les mélanges réactionnels, sont agités et incubés 5 min à 40°C.

La lecture de l'absorbance à 765 nm se fait grâce à un spectrophotomètre à UV (Ultraviolet) visible, notons qu'une droite d'étalonnage est préalablement réalisée avant l'analyse avec de l'acide gallique (0, 12.5, 25, 50, 100 et 200 $\mu\text{g/mL}$) dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser. Les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent d'acide gallique par 100 gramme de grenade (mg EAG/100g de grenade).

3.2.1.8. Identification des composés phénoliques par l'analyse de CLHP

➤ **Principe de la HPLC**

Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution d'abord, puis elle sera introduite dans la phase mobile liquide (éluant). Grâce à la répartition sélective des solutés entre la phase mobile et la phase stationnaire, chaque soluté est donc soumis à une force de rétention exercée par la phase stationnaire, et une force de mobilité due à la phase mobile. Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans un tube appelé colonne chromatographique.

La phase mobile, poussée par une pompe sous forte pression, parcourt le système chromatographique. Le mélange à analyser est injecté puis transporté à travers le système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire. En sortie de colonne, grâce à un détecteur approprié, les différents solutés sont représentés par des pics. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme (**Jean-Louis, 2001**).

Le mécanisme de la séparation chromatographique s'explique par les différences de répartition des molécules des composés d'un mélange entre deux phases non-miscibles : l'une mobile et l'autre stationnaire. Ce principe est traduit par le schéma suivant :

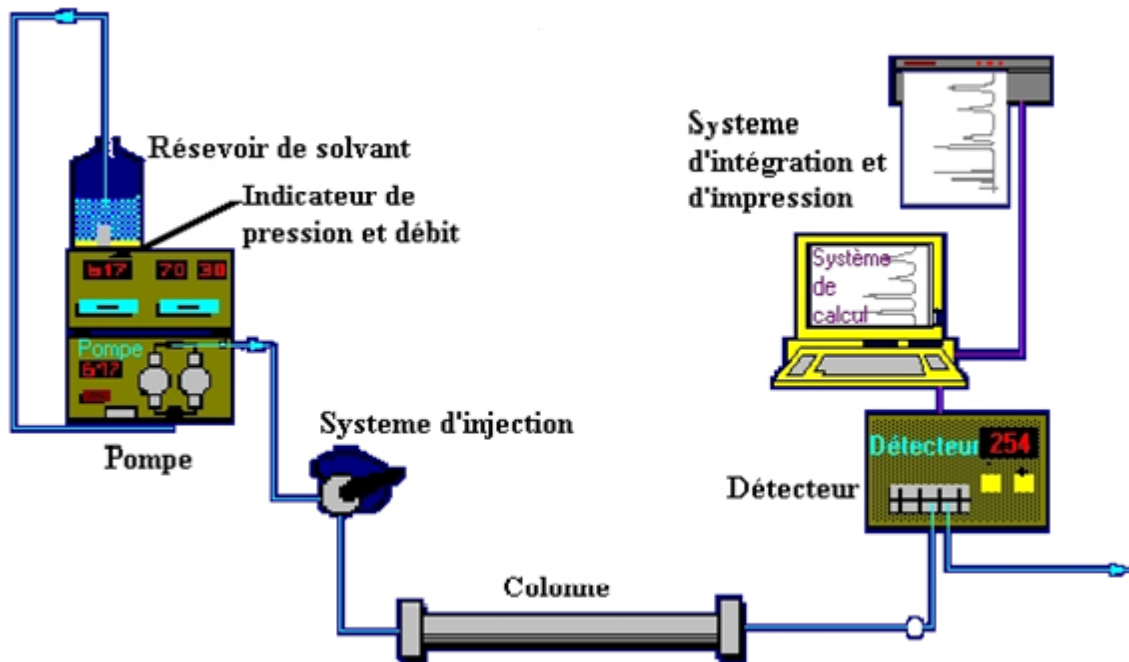


Figure 14 : Principe de fonctionnement d'une chaîne HPLC

➤ **Technique**

Les analyses CLHP sont réalisées sur une chaîne HPLC de marque (YL 9100 system, Allemagne) équipée d'un système de dégazage, d'une pompe quaternaire, d'un système d'injection manuelle, d'un détecteur et d'un système d'acquisition des données (avec un logiciel YL CLARITY pour traiter les signaux).

HPLC possède 4 compartiments :

✚ **La phase mobile**

Les composés phénoliques (extrait aqueux, méthanolique et éthanolique) sont séparés en appliquant un gradient d'éluion. Les solvants (A) et (B) correspondent respectivement aux solutions eau/acide acétique (1%) et méthanol pure grade. Eau acidifiée passer par le bain ultrason suivie par le dégazage pour libérer toute les bulles.

✚ **La pompe**

Elle doit fournir la phase mobile à un débit 1ml/mn et une pression de 70 pour atteindre la colonne.

L'injection de l'extrait dilué de composés phénoliques (20 µL) se fait par une micro-seringue qui passe par un filtre seringue (0,45µm) et l'élution des composés phénoliques se fait pendant 60 min. L'analyse des composés phénoliques sont lancées

A l'aide de la pompe qui réalise le mélange demandé presse l'échantillon à la colonne.

la phase stationnaire (La colonne)

La colonne est l'élément majeur de la chaîne HPLC pour la séparation de l'extrait analysée.

Parmi les colonnes le plus utilisées c'est : C18 (250 x 4,6 mm, ayant des particules de 5 µm et des pores de 110 Å), thermostatée à 30°C qui a plusieurs avantages pour les analyses des produits pharmaceutiques et les composés phénoliques par HPLC

Détecteur et l'enregistreur

-Le détecteur UV-visible est nécessaire puisqu'il permet de suivre en continu la séparation et de mesurer la concentration des extraits.

-L'enregistreur reçoit un signal électrique proportionnel à la concentration de l'analyte qui traverse le détecteur. Ce signal est traité, amplifié puis utilisé pour tracer le chromatogramme.

Les chromatogrammes ont été enregistrés et leur traitement a été exploité en utilisant le logiciel YL CLARITY.

Les composés phénoliques sont identifiés à partir de leurs longueurs d'onde et le temps de rétention. L'identification des composés phénoliques est effectuée en comparant les pics trouvés à des étalons de références bien déterminés.

3.2.1.9. Etude de l'activité antibactérienne des extraits du fruit *Punica granatum*

Parmi les 62 BLSE+ trouvées durant la période de stage on a appliqué nos extraits que sur 20 souches BLSE+ qui sont les plus résistantes entre elle et qui ont des mécanismes résistances associées à d'autres famille d'antibiotique (aminosides, quinolones). Nous avons utilisé la méthode de diffusion en milieu gélosé.

Le principe de cette méthode est d'utiliser des disques de 9mm de diamètre. Les disques ont été imprégnés par 50µl de des différentes solutions des extraits Puis déposés à la surface d'un milieu écouvillonné par une suspension bactérienne d'une densité optique de 0.5Mc Farland. A la fin la durée d'incubation 18-24 heures à 37 °C, les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés (Choi et al., 2006 ; Debib et al., 2014).

3.2.1.10. Analyse Statistique

Toutes les expériences ont été faites en triple, les résultats ont été présentés par la moyenne avec son écart type (moyenne \pm ET et n=3). La recherche d'une corrélation entre la densité optique et la concentration des étalons et des échantillons, a fait appel au test de corrélation ou de régression linéaire simple. Les données recueillies ont été saisies sur office 2013 et Excel.

Table de matières

Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Résumé, Abstract, ملخص	
Introduction générale	1
Chapitre I : Etude bibliographique	
1. <i>Punica granatum</i>	3
1.1. Généralités	3
1.2. Description botanique	3
1.3. Nomenclature	6
1.4. Classification	6
1.5. Composition chimique	7
1.6. Principaux composés phénoliques du fruit <i>Punica granatum</i>	8
1.7. Activités thérapeutiques de l'écorce de <i>Punica granatum</i> L.	10
2. Les entérobactéries	10
3. Les bêta-lactamines	11
3.1. Historique	11
3.2. Définition	11
3.3. Structure	12
3.4. Classification des bêta-lactamases	12
3.5. Mode d'action des β -lactamines	13
3.6. Mécanismes de la résistance	14
4. Anti-bio résistance	16
5. Les bêta-lactamase à spectre étendu (BLSE)	18
5.1. Les entérobactéries BLSE	18
5.2. Classification des BLSE	19
5.3. Epidémiologie des entérobactéries productrices de BLSE	21
Chapitre II : Matériel et méthodes	
1. Objectifs	22

2. Le lieu de travail	22
3. Matériel et Méthodes	22
3.1. Matériel	22
3.1.1. Matériel non biologique	22
3.1.2. Matériel biologique	22
3.1.3. Matériel végétal	23
3.2. Méthodes	23
3.2.1. Isolement et identification des germes pathogènes	23
3.2.1.1. Techniques de prélèvement	25
3.2.1.2. Méthodologie de diagnostic	25
3.2.1.3. Identification	27
3.2.1.4. Etude de la sensibilité des souches d'entérobactéries aux antibiotiques	33
3.2.1.5. Recherche phénotypique de la production des BLSE	35
3.2.1.6. Extraction des composés phénoliques	37
3.2.1.7. Dosages des polyphénols par colorimétrie	39
3.2.1.8. Identification des composés phénoliques par analyse HPLC	40
3.2.1.9. Etude de l'activité antibactérienne des extraits du fruit <i>Punica granatum</i>	42
3.2.1.10. Analyse statistique	43
Chapitre III : Résultats et discussion	
1. Répartition des prélèvements selon leur provenance	44
2. Répartition des patients selon la nature de prélèvement	44
3. Isolement	45
4. Identification	46
4.1. Examen macroscopique	46
4.2. Observation à l'état frais et coloration de Gram	47
4.3. Identification biochimique	47
4.4. Répartition des espèces E-BLSE positif	50
4.5. Répartition des BLSE positif selon le sexe des patients	51
4.6. Répartition des souches E-BLSE positif selon l'âge	52
4.7. Répartition des souches E-BLSE positif selon la nature de prélèvement	53
5. Sensibilité des souches vis-à-vis les antibiotiques	53
6. Sélection des souches les plus résistantes pour l'étude de l'activité antibactérienne	55

7. Extraction	57
8. Dosage spectrophotométrique (UV) des polyphénols totaux	58
9. Analyse HPLC des polyphénols de la peau du fruit <i>Punica granatum</i>	61
10. L'activité antibactérienne des extraits	63
Conclusion	70
Références bibliographiques	
Annexe	

Liste des figures

Figure 1 :		
Figure 2 :		
	:	

Liste des tableaux

Tableau I :		
Tableau II :		
Tableau III :		
Tableau IV :		
Tableau V :		
Tableau VI :		
Tableau VII :		

Liste des abréviations

Résultats et discussion

Cette dernière partie comporte tous les résultats obtenus au cours des expériences au laboratoire ainsi que leurs interprétations.

Durant notre période d'étude de 4 mois au niveau du laboratoire central de l'hôpital **PEHS EL HADI FLICI (El kettar)** à Alger du 18 février au 14 juin 2018. Au total, 2487 prélèvements ont été recueillis et analysés.

1- Répartition des prélèvements selon leur provenance

Sur, 2487 prélèvements recueillis 2089 soit des prélèvements issus des patients non hospitalisés, et 398 issus de patients hospitalisés (**figure : 15**).

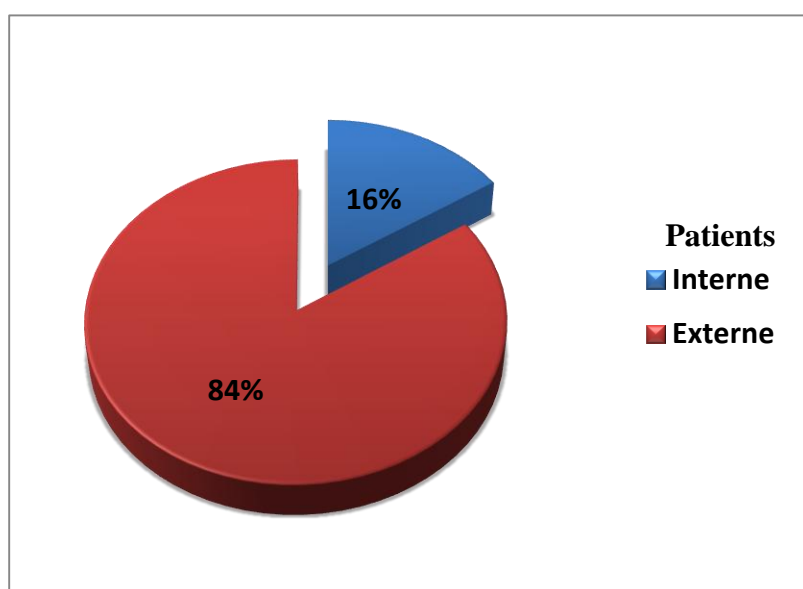


Figure 15 : Répartition des prélèvements selon leur provenance.

2- Répartition des patients selon la nature de prélèvement.

Le taux le plus élevé est représenté par des prélèvements urinaires 47.81%, suivi par les prélèvements de LCR avec 40.93% et de pus par 11.26% (**Tableau III**).

Tableau III : Répartition des cas positifs et négatifs selon le type de prélèvement

Types de prélèvements	urines	Divers (pus)	LCR	Total
Positifs	394	114	862	1370
Négatifs	795	166	156	1117
Total	1189	280	1018	2487
Pourcentages %	47.81	11.26	40.93	100

3-Isolement

Sur les 2487 prélèvements, 1117 prélèvements ont été négatifs et 1370 positifs. Parmi ces derniers, 394 sont des prélèvements urinaires, 862 LCR et 114 pus (**figure 16**).

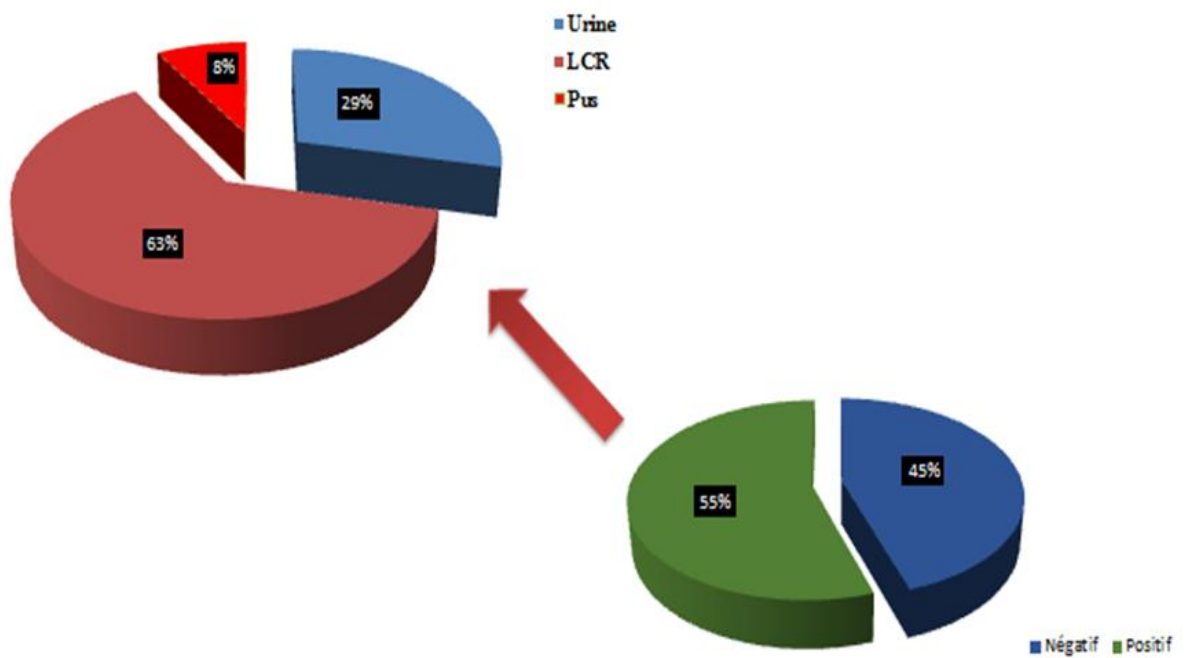


Figure 16 : Distribution des prélèvements positifs selon leur nature.

4- Identification

4.1 Examen macroscopiques

L'observation macroscopique des colonies a été faite sur les milieux sélectifs et sur la gélose nutritive utilisée. Elle nous a permis d'orienter l'identification qui a été confirmée par l'identification biochimique et MALDI-OF-MS.

Tableau IV : Description de différentes colonies isolées

Milieux de cultures	Identification phénotypique des colonies				
	Couleur	Forme Relief	Opacité consistance	Contour Bords	Taille
Hektoen	-Saumons + virage vers l'orange	-Ronde, Plate	-Opaque sèche	-Régulière irrégulier rugueux	~1- 2mm
	-Verdâtre	-Ronde, Bombé	-Opaque crémeuse	-Régulière Lisse	~ 1mm

➤ *Escherichia coli* :

- **Sur Hektoen** : les colonies apparaissent plates d'une couleur rouge brique (saumon) d'un diamètre de 1-2mm. plus ou moins petite.

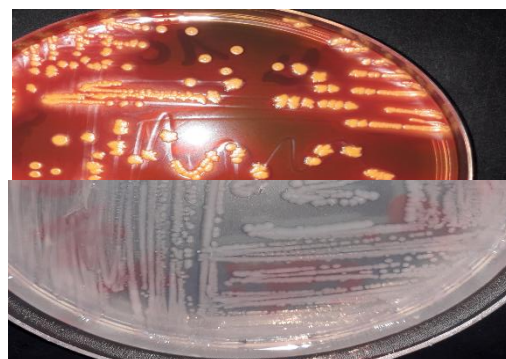


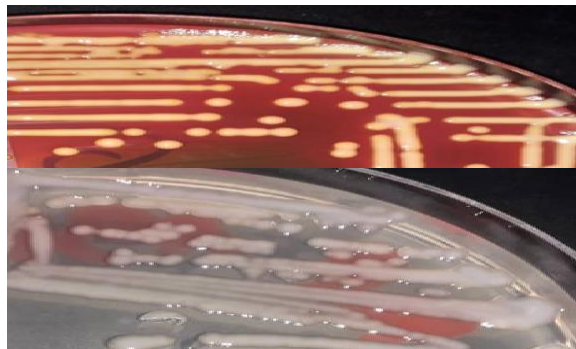
Figure 17 : Aspect macroscopique d'*E.coli* sur GN et Hektoen (Originale, 2018).

➤ *Citrobacter koseri* :

- **Sur l'Hektoen** : des colonies saumons d'un diamètre entre 0,5mm -1.5mm (très petite taille), d'une consistance sèche et contour plus ou moins irrégulier.



Figure 18 : Aspect macroscopique de *Citrobacter koseri* sur GN et Hektoen (Originale,2018).



➤ *Klebsiella pneumoniae* :

- Sur **Hektoen** : les colonies apparaissent bombé et lisse d'une couleur saumons, crémeuse (muqueuse), contour régulièrement ronde.

Figure 19 : Aspect macroscopique de *Klebsiella pneumoniae* sur milieu GN et Hektoen (Originale, 2018).

4.2. L'observation à l'état frais et coloration de Gram.

Cette observation microscopique a montré que ces souches ont une forme bâtonnet plus ou moins petite avec des extrémités arrondies.

D'après la coloration de Gram, ces derniers apparaissent avec une couleur rose ; ce qui signifie qu'ils font partie des Gram négatifs (**Figure 20**).

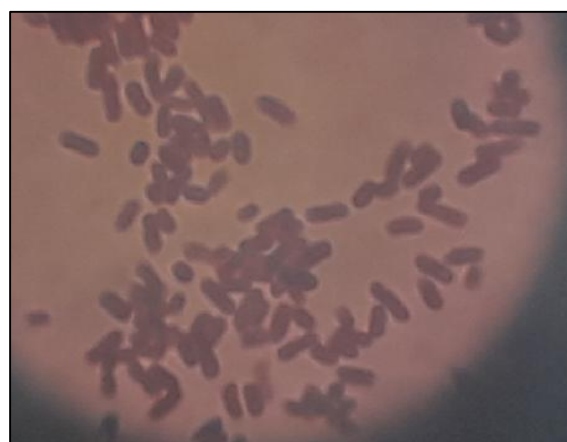


Figure 20 : La coloration de Gram
d'Escherichia coli(G100X)

4.3. Identification biochimique

L'identification biochimique a été réalisée en utilisant la galerie API 20^E et confirmé par la méthode MALDI-TOF- MS.

Les résultats sont illustrés dans le tableau XII (voir annexe III).



Figure 21 : Exemple de lecture de la microgalérie API 20^E d'*E. cloacae*.

L'identification par spectromètre de masse MALDI-TOF-MS (Microflex), des 20 souches d'entérobactéries productrices de BLSE, a donné de très bon score de 1.9 et 2.4 ce qui nous a permis de confirmer l'identification de nos souches réalisée par la galerie API 20^E (Tableau V).

Tableau V : Scores d'identification bactérienne obtenue par MALDI-TOF

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (+++)	Escherichia coli MB11464 1 CHB	2.385	562
2 (++)	Escherichia coli RV412_A1_2010_06a LBK	2.238	562
3 (++)	Escherichia coli Nissl VML	2.171	562
4 (++)	Escherichia coli ATCC 25922 THL	2.133	562
5 (++)	Escherichia coli ATCC 35218 CHB	2.132	562
6 (++)	Escherichia coli DH5alpha BRL	2.072	562
7 (++)	Escherichia coli DSM 30083T HAM	2.017	562
8 (+)	Escherichia coli ATCC 25922 CHB	1.986	562
9 (+)	Escherichia coli ESBL_EA_RSS_1528T CHB	1.968	562
10 (+)	Escherichia coli B421 UFL	1.96	562

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (++)	Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae 9295_1 CHB	2.287	72407
2 (++)	Klebsiella pneumoniae RV_BA_03_B LBK	2.258	573
3 (++)	Klebsiella pneumoniae 37595 PFM	2.231	573
4 (++)	Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae DSM 30104T HAM	2.186	72407
5 (++)	Klebsiella pneumoniae 37585 PFM	2.12	573
6 (++)	Klebsiella pneumoniae ssp ozaenae DSM 16358T HAM	2.064	574

L'ensemble des tests biochimiques réalisés sur les souches isolées des prélèvements positifs ont révélé que parmi les 1370 prélèvements positifs, 309 (23%) souches appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae* et 1061 souches appartiennent à d'autre famille.

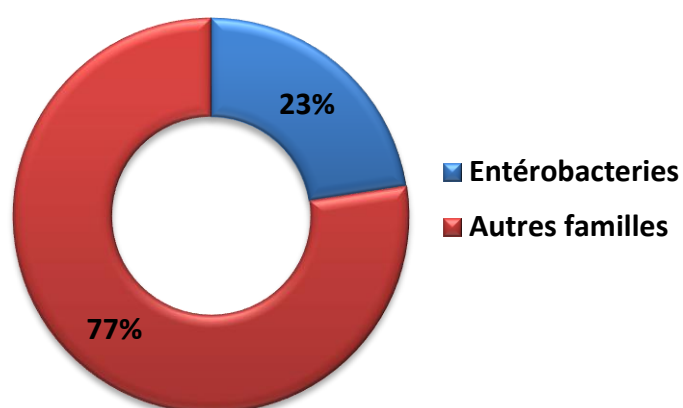


Figure 22 : Fréquence des entérobactéries identifiées.

4.4. Répartition des espèces d'entérobactéries BLSE positifs

Après la réalisation de l'antibiogramme et les tests de détection des β -lactamases les résultats nous ont permis de constater que parmi les 309 entérobactéries isolées, 62 d'entre elles avaient la capacité de produire une β -lactamase à spectre élargi (BLSE), soit une prévalence de 20%. Les 247 autres bactéries (80%) ne possèdent pas cette enzyme (**Figure 23**).

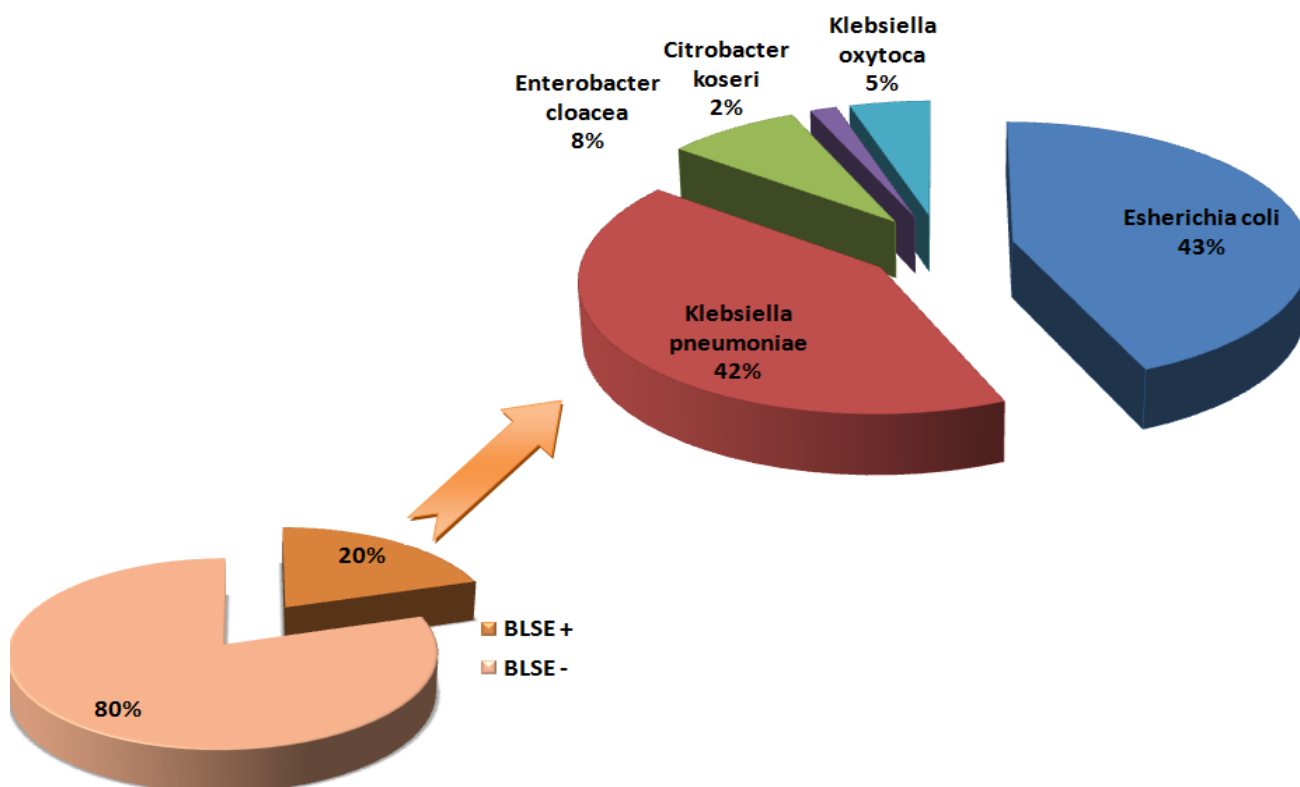


Figure 23 : Répartition de l'ensemble des souches d'entérobactéries BLSE positif identifiées.

Parmi les 62 souches d'entérobactéries BLSE positif identifiées, la dominance a été attribuée à *Escherichia coli* (27 souches) avec *Klebsiella pneumoniae* (26 souches), suivi par l'espèce d'*Enterobacter cloacea* avec 05 souches et *Klebsiella oxytoca*, avec 03 souches, et finalement *Citrobacter koseri* (01 souches).

Ces résultats se traduisent par la production des β -lactamases à spectre élargi (BLSE) qui constitue le mécanisme le plus répandus chez les entérobactéries et dont l'incidence n'a pas cessé d'augmenter (**Benjelloun et al, 2013**).

L'incidence des souches d'entérobactéries productrices de BLSE trouvé dans notre étude est proche de celle retrouvée au Maroc (23%) par (**Benjelloun et al, 2013**).

Concernant les espèces identifiées, (Touchene et Ghalmi, 2015) ont trouvé à la première place, *E. coli* avec un pourcentage de 79%, suivie de *Klebsiella pneumoniae* et *Klebsiella oxytoca* avec un même taux de 10,5% chacune.

Une distribution similaire a été obtenue pour les deux premières espèces dans deux hôpitaux belges avec *Escherichia coli* : 39,9% et 56,8% et *Klebsiella pneumoniae* : 9,4% et 8,9% respectivement en 2006 et 2008 (Glupczynski, 2008).

Par ailleurs, une étude SMART a rapportée des taux de 57,27% et 22,95% pour *E. coli* et *Klebsiella pneumoniae* respectivement (Haws et al, 2012).

Les chiffres élevés de ces deux espèces illustrent leur facilité de dissémination et de production des résistances ainsi que leurs capacités à s'adapter à leur environnement et de se développer avec le risque de transmissibilité entre les malades, surtout en milieu hospitalier, chez qui, le risque majeur est l'impasse thérapeutique (Khayar, 2011).

4.5. Répartition des souches BLSE positif selon le sexe des patients

D'après les résultats obtenus durant le stage, et parmi les 62 d'entérobactéries BLSE positif on constate que le nombre des cas positifs est élevé chez les hommes avec un pourcentage de 53% en comparaison avec celui des femmes qui représente 47%. Le sex-ratio homme/femme = $33/29 = 1.13$.

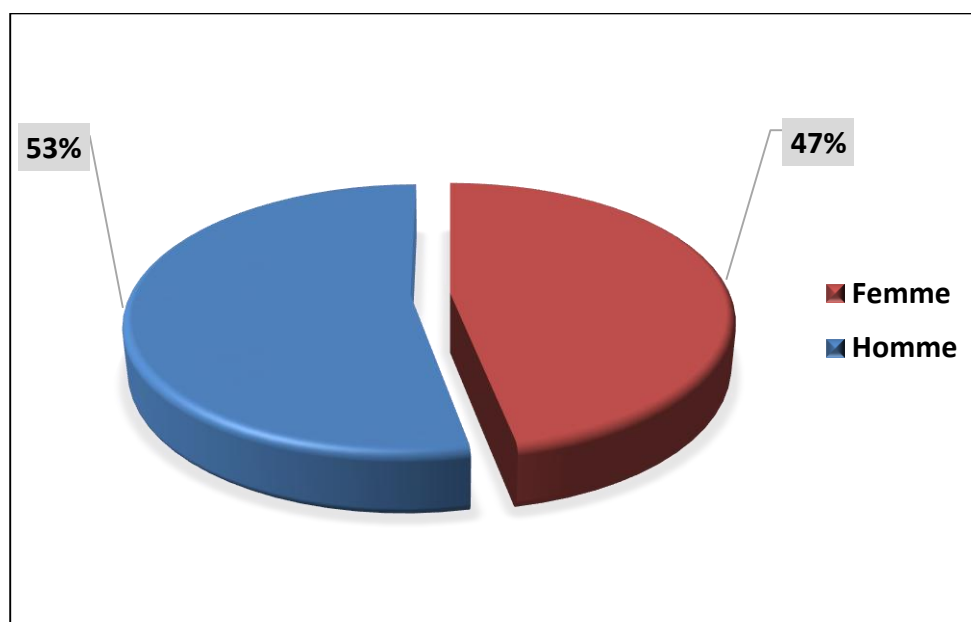


Figure 24 : Répartition des souches d'entérobactéries BLSE positif selon le sexe.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans une étude réalisée à Rabat (**Ait Miloud, 2011**) avec des valeurs presque identiques. Par ailleurs, nos résultats sont différents des résultats trouvés par (**Touchene et Ghalmi, 2015**), qui ont trouvé une prédominance féminine.

4.6. Répartition des souches d'entérobactéries BLSE positif selon l'âge des patients

La fréquence la plus élevée des souches d'entérobactéries BLSE positif a été observée beaucoup plus, chez des patients appartenant à la catégorie d'âges situées entre 15-30 ans, suivi par la catégorie 02-15 ans, et la catégorie des nourrissons (1J à 2 ans). En revanche chez les patients âgés on n'a isolé que 4 souches (**Figure 25**).

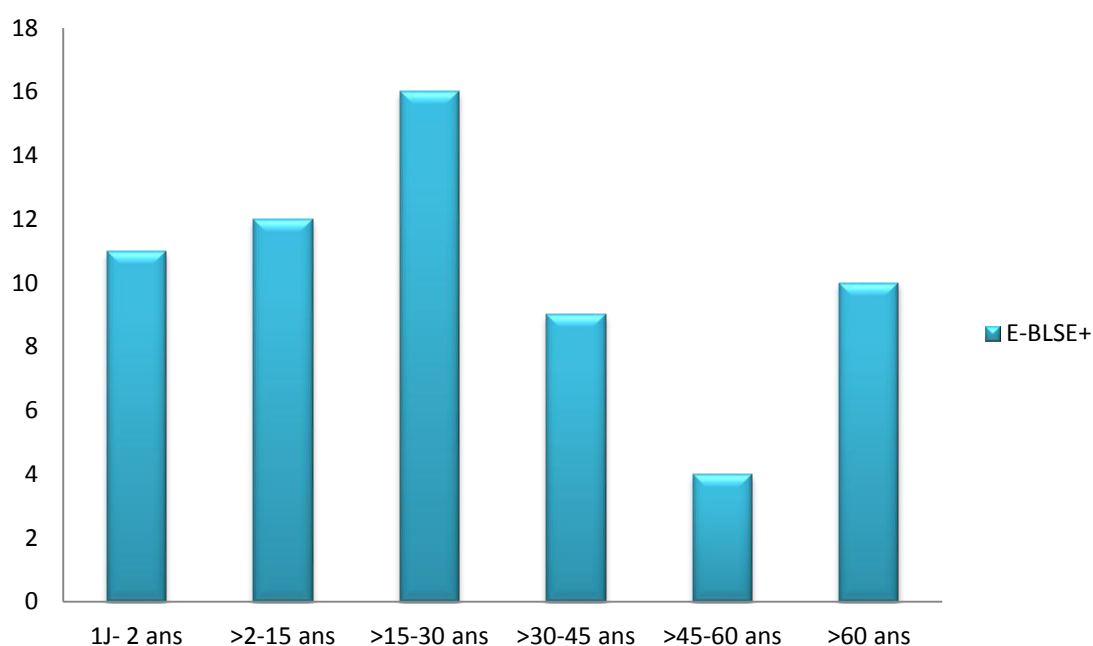


Figure 25 : Répartition des souches d'entérobactéries BLSE positif selon l'âge des patients

Ces résultats sont différents des résultats d'une récente étude (**Thibaut, 2018**) dans laquelle les auteurs ont trouvé que le pourcentage de souches BLSE est plus important lorsque l'âge des patients augmente (en 2016, 2,0 % pour la classe d'âge < à 15 ans vs 6,0 % pour la classe d'âge > à 75 ans). Ils ont remarqué qu'entre 2012 et 2016, pour l'ensemble des classes d'âges, la proportion de BLSE augmente avec des différences significatives (**Thibaut, 2018**).

4.7. Répartition des souches d'entérobactéries BLSE positif selon la nature de prélèvement

En effet On remarque que les souches trouvées productrices de BLSE isolées des urines sont les plus abondants, pour les cinq espèces *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca*, et *Citrobacter koseri*

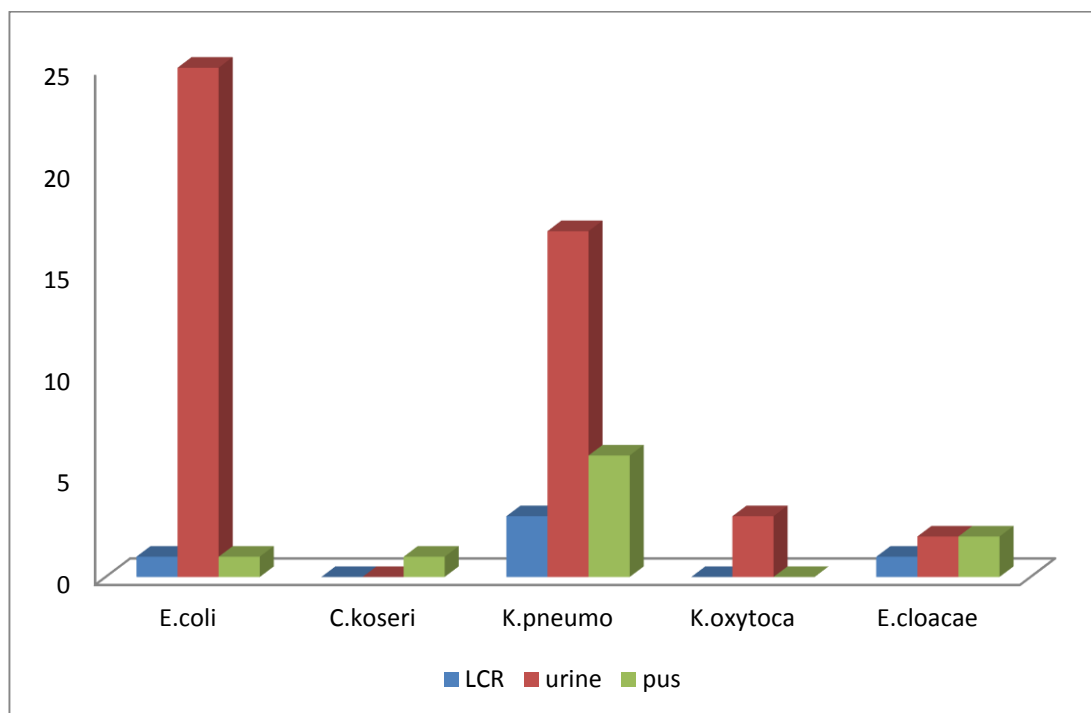


Figure 26 : Répartition des espèces selon la nature de prélèvement

Un total de 47 soit 76% souches d'entérobactéries a été isolé des urines 10 de pus (16%), et 05 (8%) du LCR. Ces résultats sont expliqués par le fait que les infections urinaires représentent le deuxième motif de consultation en pathologie infectieuse après les infections respiratoires et la première cause d'infections nosocomiales (**Anglaret et al., 2002**).

5. Sensibilité des souches vis-à-vis les antibiotiques

L'interprétation de l'antibiogramme (sensible, intermédiaire et résistante) a été faite conformément aux recommandations du (**CLSI, 2014**) et le réseau national de surveillance de l'antibiorésistance (**AARN, 2011**).

Les résultats de l'étude de la Résistance/Sensibilité des 62 souches BLSE aux antibiotiques testés sont illustrés dans la (**Figure 27**). On remarque globalement que la plupart des souches testées ont développé une résistance en particulier sur AMC, CTX/CRO, ATM, GN, SXT, CIP et en quelque sorte la CAZ. En revanche, on constate que les différentes souches sont sensibles au IPM, et AMK.

En effet, la résistance aux bêta-lactamines chez les entérobactéries peut être causée par plusieurs mécanismes cités précédemment, est majoritairement causée par un mécanisme d'inactivation enzymatique, par l'hydrolyse du noyau bêta-lactamase par l'action d'une bêta-lactamase.

Au cours des 70 dernières années, l'utilisation des bêta-lactamines, incluant les nouvelles -lactamines comme les C₃G et les carbapénèmes, ayant un spectre d'action de plus en plus large envers les BGN, a sélectionné des enzymes de type bêta-lactamases, chacune plus puissante que la précédente.

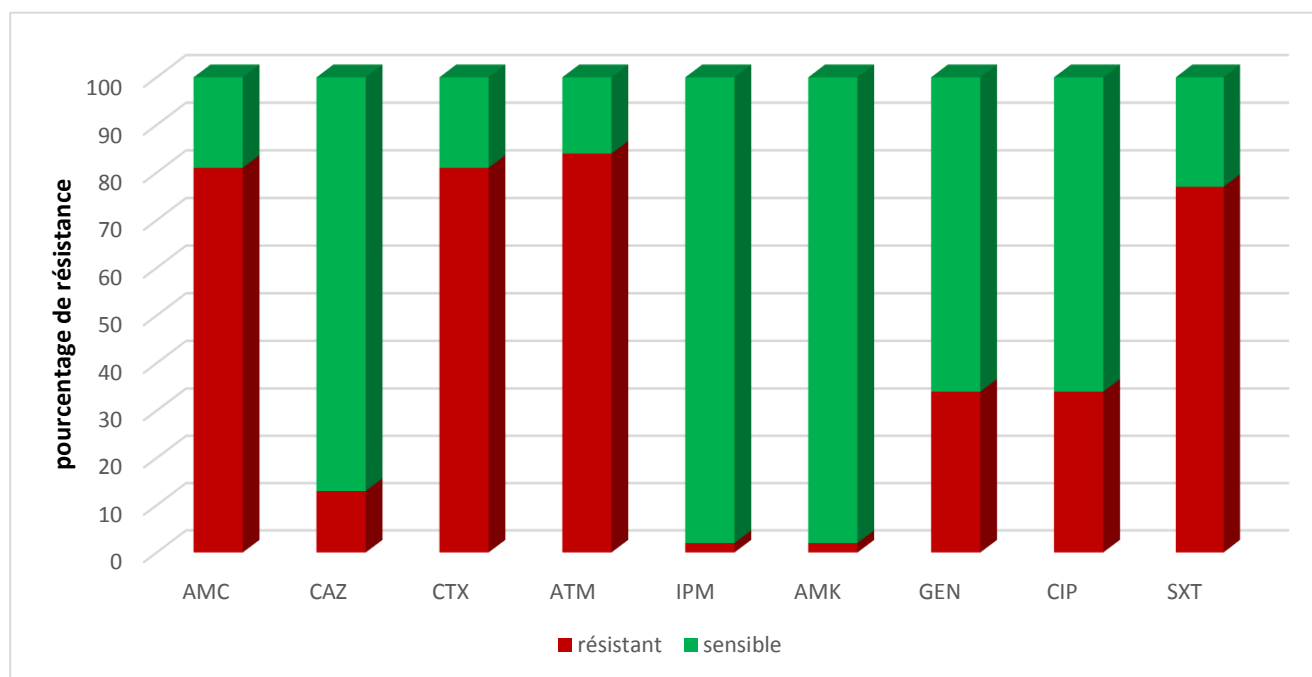


Figure 27 : Résultats de la Résistance/Sensibilité des 62 souches BLSE aux antibiotiques testés

La résistance des bactéries à Gram négatif a pris de l'importance les dernières années. En effet, l'**Infectious Diseases Society of America (IDSA)** a récemment relevé six bactéries regroupées sous le nom « ESKAPE » dont , *Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et les espèces d'*Enterobacter* qui sont responsables des deux-tiers des infections acquises en milieu hospitalier et dont les deux-tiers sont des bactéries à Gram négatif (**Boucher et al., 2009**).

Les offices de surveillance de l'antibiorésistance, estiment que les E-BLSE sont la menace la plus importante par leur fréquence. De ce fait, l'OMS identifie ce phénomène comme une menace de santé publique majeure. Le taux de mortalité associé à une infection bactérienne par une souche à Gram négatif résistante aux bêtalactamines est de 2 à 4 fois plus élevé que celui associé à une infection causée par une souche sensible (Boucher *et al.*, 2009).

6. Sélection des souches les plus résistantes pour l'étude de l'activité antibactérienne.

Parmi les 62 souches trouvées productrices de bêta-lactamases durant la période de notre stage on a choisi 20 souches pour l'étude de l'activité anti-bactérienne aux extraits de la peau du fruit *Punica granatum*. Ces souches ont présenté d'autres mécanismes de résistances que la production des bêta-lactamases (résistance associée à d'autres familles d'antibiotiques ; aminosides et les quinolones).

Les résultats de l'étude de l'antibiogramme des 20 souches BLSE sélectionnées sont résumés dans le **Tableau VI** et illustrés dans la (**Figure 28**).

Tableau VI : Résultats de l'antibiogramme des 20 souches BLSE positifs vis-a-vis les antibiotiques testés.

	AM C	CTX /CRO	ATM	CAZ	IPM	GN	AMK	SXT	CIP
<i>E. coli. 1</i>	R	R	R	/	S	S	S	S	R
<i>E. coli 2</i>	R	R	R	/	S	R	S	R	R
<i>E. coli 3</i>	R	R	R	/	S	R	S	R	R
<i>E. coli 4</i>	R	R	R	/	S	R	S	R	I
<i>E. coli 5</i>	R	R	R	/	S	R	S	R	R
<i>E. coli 6</i>	R	R	R	R	S	R	S	S	
<i>E. coli 7</i>	R	R	R	/	S	R	S	R	
<i>K.pneumonea1</i>	R	R	R	/	S	R	S	R	
<i>K pneumonea2</i>	R	R	R	/	S	R	S	R	R
<i>K. pneumonea3</i>	R	R	I	/	S	R	S	R	R
<i>K. pneumonea4</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>K. pneumonea5</i>	R	R	R	/	S	R	S	R	R
<i>K. pneumonea6</i>	R	R	R	/	S	R	S	R	R

<i>K. pneumoniae</i> 7	R	R	R	/	S	R	S	R	R
<i>K. pneumoniae</i> 8	R	R	R	/	S	R	S	R	S
<i>E. cloacea</i> 1	R	R	R	/	S	R	S	R	R
<i>E. cloacea</i> 2	R	R	R	/	S	R	S	R	R
<i>E. cloacea</i> 3	R	R	R	/	S	R	S	R	R
<i>K. oxytoca</i>	R	R	R	/	S	R	S	R	R
<i>C. kosri</i>	R	R	R	/	S	R	S	R	/
ATCC 22925 <i>E. coli</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S

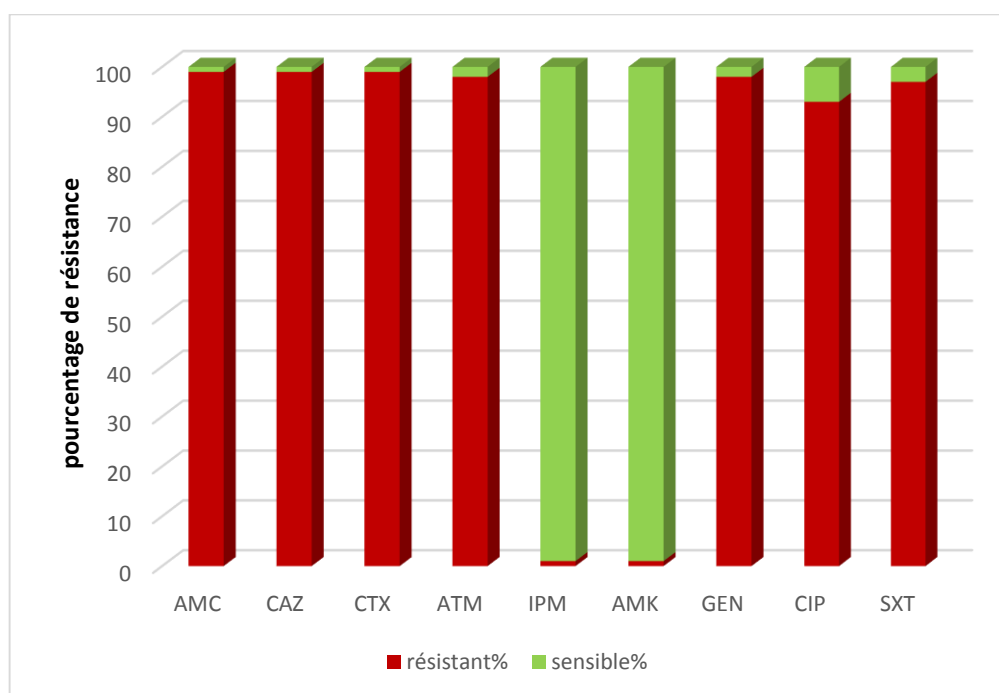


Figure 28 : Etude de la Résistance/Sensibilité des 20 souches BLSE aux antibiotiques testés

On remarque qu'*Escherichia coli* qui est une espèce qui est normalement sensible à tous les β -lactamines (Sougakoff et Trystman, 2003) a montré une résistance bien claire à AMC, CTX/CRO et ATM qui est due probablement à la présence d'une céphalosporinase à haut niveau ou de bas niveau (Ndiaye., 2005).

D'après nos résultats de l'antibiogramme, les huit souches *K. pneumoniae* développent une sorte de résistance *vis-à-vis* AMC dont elle est normalement sensible, cela montre la

présence d'une résistance acquise d'une enzyme qui fait partie des β -lactamases de classe A de type IRT insensible à l'acide clavulanique (**Chomarat et al., 2003**).

Elles résistent aussi aux autres antibiotiques et CTX /CRO, ATM, GEN et le SXT à 100%. Par contre elles sont sensibles à AMK et IPM. Le même profil de résistance est enregistré chez la souche *K.oxytoca* et *C kosri*.

En 2011 une étude comparative de la fréquence de BLSE chez *K. pneumoniae* entre l'Algérie et la France a déclaré que le taux des BLSE produit par *K. pneumoniae* en Algérie (88,6%) est beaucoup plus élevé à celui de France (26,8%) (**Berrazeg et al., 2013**), cette forte fréquence de résistance revient à l'utilisation massive des céphalosporines de 3eme génération dans les traitements des maladies causées par *K. pneumoniae* principalement aux unités de soins intensives.

Les *K. pneumoniae* ont présenté un haut niveau de résistance à la Gentamicine (aminosides) Par contre elles étaient sensibles à l'amikacine à l'exception de la souche *K. pneumoniae*. ces résultats sont en désaccords avec les résultats de (**Hassanzadeh et al., 2009**) qui ont rapporté une fréquence de résistance pour l'Amikacine 77,8% en Iran (**Hassanzadeh et al., 2009**).

7. Extraction

L'utilisation de différents solvants à polarité différente permet de séparer des composés selon leur degré de solubilité dans le solvant d'extraction. Ces méthodes d'extraction menées à température ambiante, permettent d'extraire le maximum des composants bioactifs et de prévenir leur dénaturation ou modification probable, dont la température élevée provoque l'inactivation des composés phénoliques, la diminution de leur extractibilité dans le solvant et affecte leur quantification (**Hagermann et al., 2000**).

La détermination des taux de rendement des différentes extractions effectuées nous a permis de rapporter nos résultats de dosage au poids frais de la peau du fruit de grenade. Ces rendements sont exprimés en pourcentage de la matière fraîche.

A travers les résultats obtenus (**Figure 29**), on remarque que les meilleurs rendements ont été obtenus par l'extrait éthanolique (59%) et méthanolique (58%), suivit par l'extrait aqueux (43%).

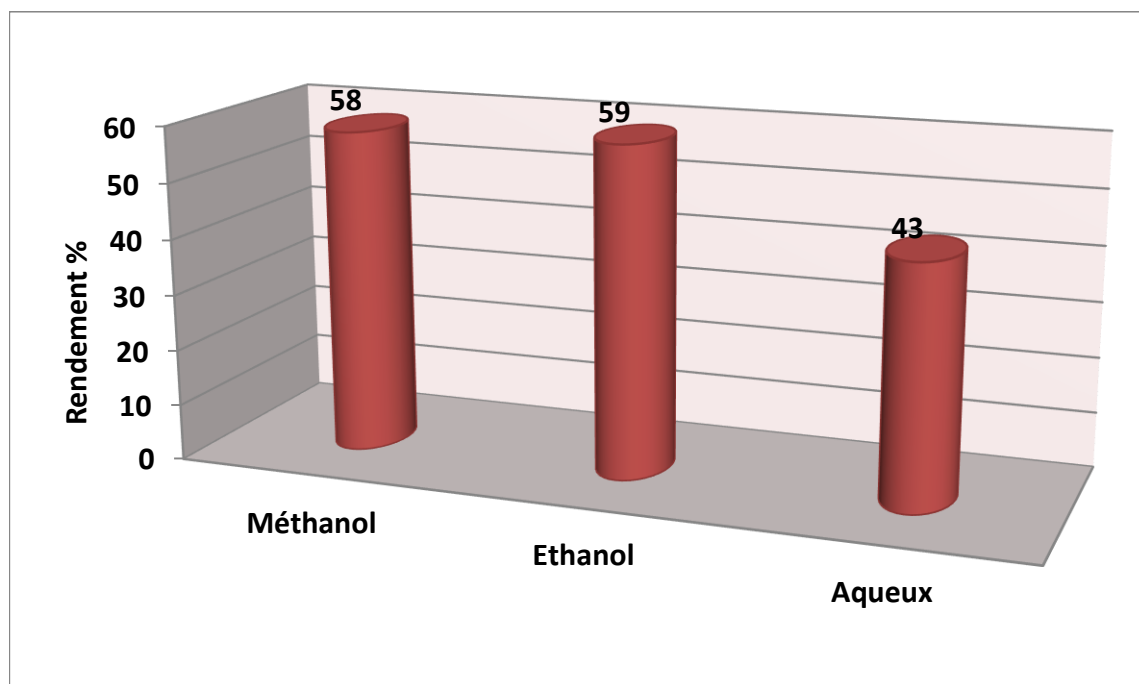


Figure 29 : Rendement d'extraction des extraits phénoliques.

Ces résultats corroborent avec ceux de (Ferhat, 2009) qui explique que le rendement variable des extraits revient à la solubilité différentielle des différents composés phénoliques dans les solvants et que cette solubilité est en fonction de leur degré de polymérisation, l'interaction avec les autres constituants et le type de solvant utilisé (Falleh et al., 2008).

Selon la littérature scientifique, l'éthanol et le méthanol sont les meilleurs solvants et que l'extraction par ultrasons augmente généralement l'efficacité d'extraction. (Thongson et al., 2004), ont rapporté que l'extraction par ultrasons ne prenait que 5 minutes pour obtenir les composants bioactifs qui présentaient l'activité antimicrobienne d'une plante médicinale (Thongson et al., 2004).

8. Dosage spectrophotométrique (UV) des polyphénols totaux

La teneur en composés phénoliques totaux de différents extraits de *Punica granatum* est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage (Figure 30). Les quantités des polyphénols correspondantes ont été exprimées en milligrammes d'équivalent en acide gallique par 100 gramme de grenade et déterminées par l'équation suivante : $y = 0.0032x + 0.1698$.

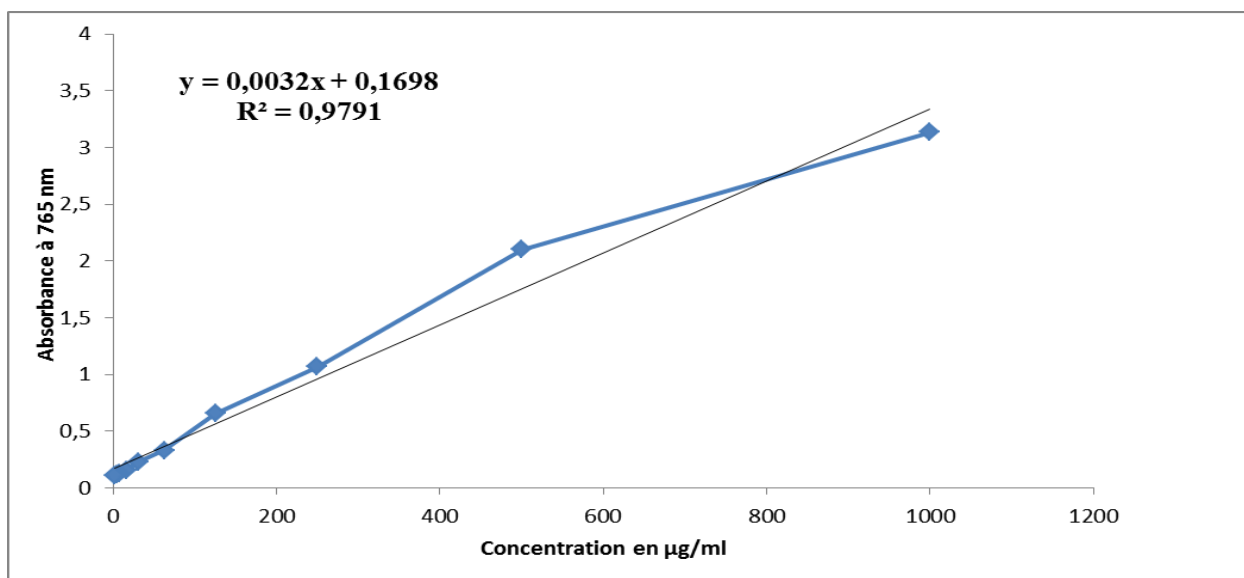


Figure 30 : Droite d'étalonnage de l'acide gallique (moyenne \pm SD de trois essais).

A la lumière de cette courbe d'étalonnage, Le contenu phénolique total de la peau de *Punica granatum* est représenté dans la (**Figure 31**).

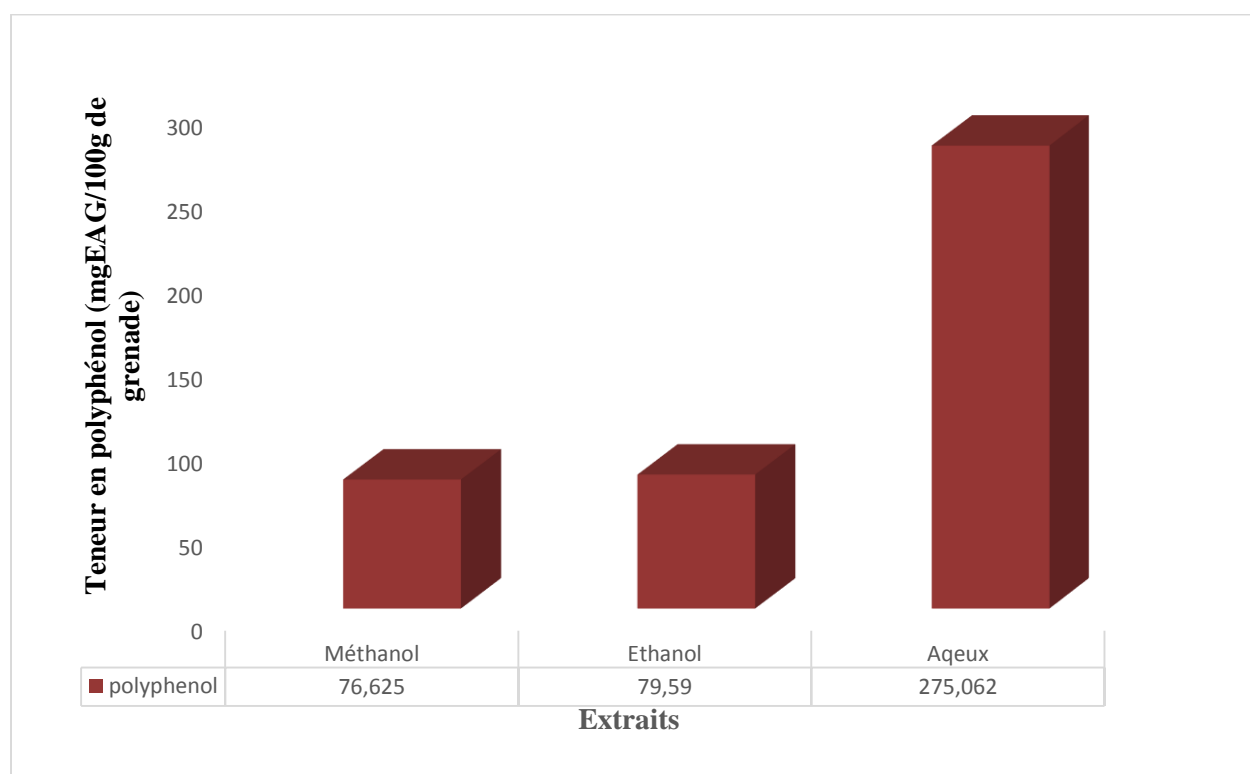


Figure 31 : la teneur en polyphénols des extraits du de *Punica granatum*.

Selon les résultats illustrés ci-dessus, on distingue que la teneur polyphénoliques de la peau du fruit *Punica granatum* dépend de la polarité de solvant. Nos résultats montrent que l'extrait aqueux est le plus riches en polyphénols avec une valeur de 275,062 mg EAG/100g de grenade. Par contre les valeurs trouvées dans l'extrait méthanolique et l'extrait éthanolique sont très proches soit 76,625 et 79,59 mg EAG/100g de grenade respectivement.

Nos résultats sont en accord avec les études précédentes ; **(Li et al., 2006)** ont constaté que la teneur totale en composés phénoliques de l'extrait de la peau du fruit *Punica granatum* était presque 10 fois plus élevée que celle de l'extrait de pulpe.. Un résultat similaire a été rapporté par **Tomas-Barberan et Espin, (2001)**, qui ont trouvé que les tissus des peaux de fruits contiennent généralement plus de phénoliques que les tissus des pulpes.

Selon **Seidel, (2005)**, l'eau et le méthanol sont deux solvants polaires qui extraient particulièrement les flavonoïdes glycosylés et les tannins. Tandis que les flavonoïdes aglycones sont extraits par les alcools ou les mélanges eau-alcool.

Généralement et selon la littérature scientifique Le contenu polyphénolique varie qualitativement et quantitativement selon plusieurs facteurs :

- Facteurs climatiques et environnementaux : la zone géographique, sécheresse, sol, agressions et maladies...etc. **(Ebrahimi et al., 2008)**.
- Le patrimoine génétique, la période de la récolte et le stade de développement de la plante **(Miliauskas et al., 2004)**, le type de polyphénol, l'état de santé du fruit, la méthode de récolte et de stockage **(Stratil et al., 2007)**.
- La méthode d'extraction et la méthode de quantification peuvent également influencer l'estimation de la teneur des phénols totaux **(Lee et al., 2003)**.

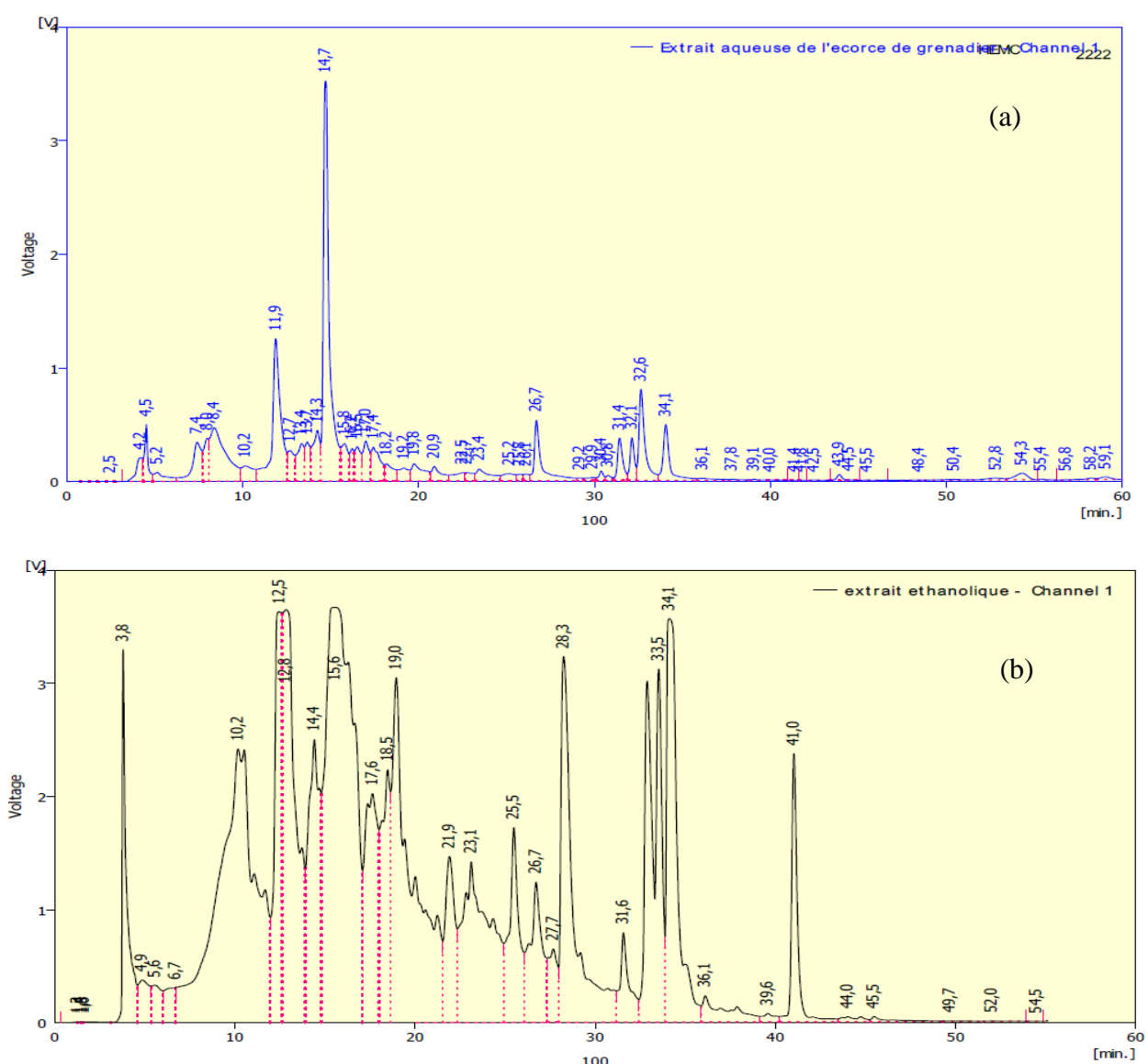
Il a été prouvé que les teneurs des phénols totaux sont élevées lorsque le milieu de vie de la plante n'est pas adéquat. Dans ce cas la plante favorise la synthèse des métabolites secondaires afin de s'adapter et survivre **(Vuorela, 2005)**.

Toutefois, il faut noter que la faible spécificité du réactif de Folin-Ciocalteu est l'inconvénient principal du dosage colorimétrique. Le réactif est extrêmement sensible à la réduction de tous les groupes d'hydroxyles non seulement celles des composés phénoliques, mais également de certains sucres et de protéines etc. **(Vuorela, 2005)**. Ainsi, le solvant d'extraction élu des substances non phénoliques comme les sucres, les protéines et les colorants qui peuvent interférer pendant toute évaluation phénolique **(Georgé et al., 2005 ; Piquemal 2008)**.

9. Analyse HPLC des polyphénols de la peau du fruit *Punica granatum*

Les chromatogrammes ont été enregistrés et leur traitement a été exploité en utilisant le logiciel YL CLARITY.

Les composés phénoliques sont identifiés à partir de leurs longueurs d'onde et de leurs temps de rétention. L'identification des composés phénoliques est effectuée en comparant les pics trouvés à des étalons de références bien déterminés. Les chromatogrammes des trois extraits testés sont illustrés dans la (Figure 32 a, b et c), et les molécules identifiées sont résumés dans le (Tableau VIII).



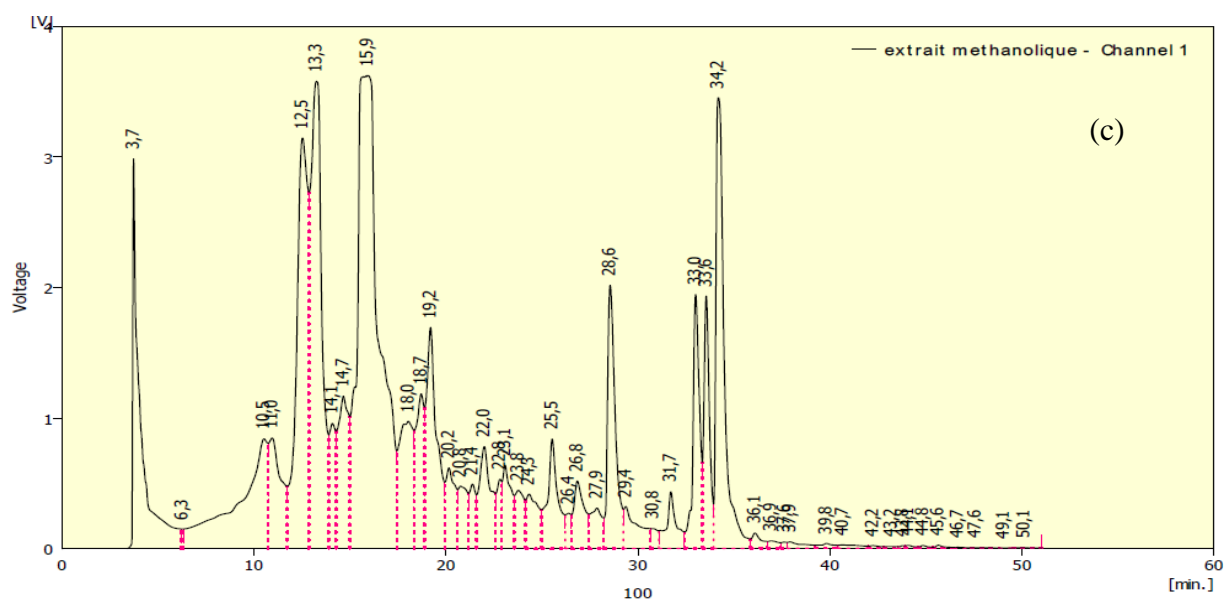


Figure 32 : Chromatogrammes de l'analyse HPLC des extraits du fruit *Punica granatum*

Tableau VII : Les composés phénoliques identifiés dans les extraits du fruit *Punica granatum*

Extrait	Temps de rétention	La hauteur (mAU)	Surface du Pic (%)	Composé
Extrait Aqueux (a)	11,883	1255,354	10,90	Resorcinol
	22,490	70,765	00,90	Epicatchin
	22,743	70,771	00,60	Ac.vanillique
	25,173	61,242	00,80	Ac.trans cinamic
	29,897	26,137	00,30	Berberine
	30,780	44,058	00,20	Ac .salicylique
	32,130	375,966	01,70	Euleropeine
Extrait éthanolique (b)	28,253	3235,007	06,10	Acide 3 hydroxy 4-metoxy cinamic
Extrait méthanolique (c)	22,003	782,354	02,20	Ac.Syringique
	29,373	321,557	01,10	Berberine
	30,797	152,666	00,30	Ac .salicylique
	33,010	1945,124	03,00	Ac.M Anisique
	36,930	57,314	00,10	Quercitine
	29,373	321,557	01,10	Berberine

Les composés phénoliques présents dans les trois extraits étudiés étaient des flavonoïdes et des acides phénoliques. Spécifiquement on a identifié l'acide vanillinique et l'acide trans-cinamique et l'acide salicylique dans l'extrait aqueux. En revanche on a trouvé l'acide syringique l'acide Manisique et l'acide salicylique dans l'extrait méthanolique. Alors que dans l'extrait méthanolique on n'a trouvé que l'acide 3-hydroxy-4-metoxy cinamique.

Les flavonoides identifiés sont la quercitine, la resorcinol, l'epicatechine et la berberine.

On a identifié aussi dans l'extrait aqueux l'oleuropeine un ortho-diphénol qui est très fréquemment identifié dans le fruit de l'olivier.

10. L'activité antibactérienne des extraits

L'activité antibactérienne s'est manifestée par l'apparition des zones d'inhibition autour des disques imprégnés d'extrait étudié. Les résultats sont présentés dans la **Figure 33**.

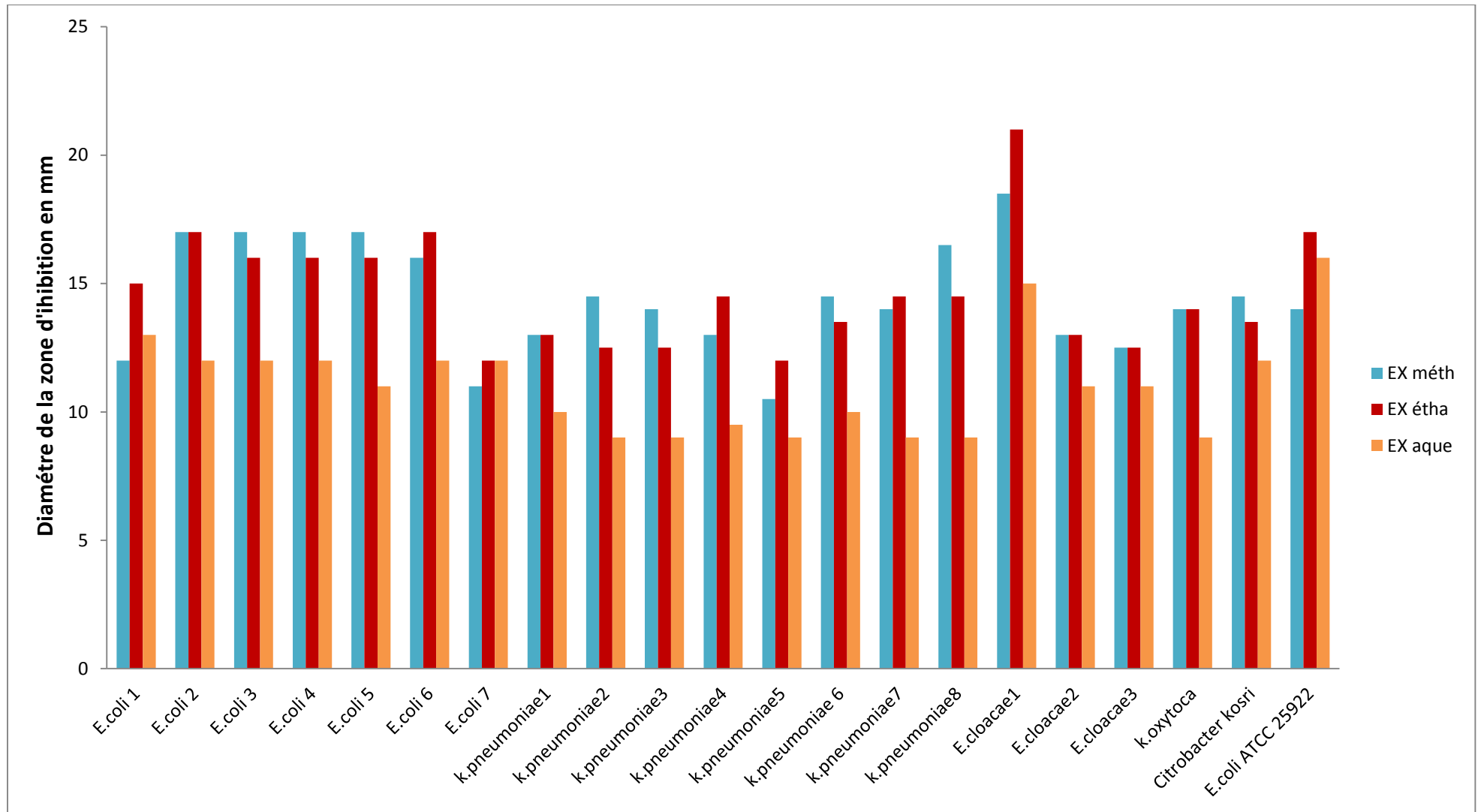


Figure 33 : Diamètre des zones d'inhibition de la croissance bactérienne obtenue en présence des différents extraits.

On remarque globalement que le diamètre de la zone d'inhibition diffère d'une bactérie à une autre et d'un extrait un autre. Il apparaît clairement que toutes les souches bactériennes testées sont inhibées au moins par l'un des extraits, ce qui confirme le spectre large de l'activité antibactérienne de la peau de ce fruit.

Comme cela a été rapporté dans la littérature, nous avons considéré qu'un extrait a une action bactériostatique si son diamètre d'inhibition est supérieur à 12 mm (Sağdaç, 2003).

D'après nos résultats obtenus de l'aromatogramme, on remarque que les diamètres des zones d'inhibitions varient entre : 9mm à 21mm, ce qui indique un large spectre, La valeur maximale a été notée pour les 3 extraits polaires avec un diamètre de 21 mm sur *Enterobacter cloacae*.

L'extrait éthanolique de la peau a inhibé surtout l'espèce *E.coli* et *Enterobacter cloacae*. Où le diamètre est supérieur ou égale 21mm et pour *Citrobacter koseri* (appelée également *Citrobacter diversus*) 13,5mm, *E.coli* (17mm), *Klebseilla oxytoca* (14mm), mais *K. pneumonea* reste plus ou moins sensible à ce type d'extrait (Figure 34)

La souche *K. pneumoniae 4* a été trouvé pan-résistante (résistante aux tous les antibiotiques testés) par contre elle était sensible aux trois extraits ces résultats sont différents à ceux trouvés par Paul, 2016 ; Abdalnabi et al (2008) qui ont révélé une résistance totale des souches de *K. pneumoniae* à l'extrait aqueux de la peau du fruit *Punica granatum*.

(Elkamali et al., 2015), ont trouvé que le péricarpe de *P. granatum* était efficace contre les bactéries testées (*Staphylococcus aureus*, *P. aeruginosa* *E. coli* et quelques isolats de *Salmonella typhi*.) mais chez *Klebsiella pneumoniae* et quelques isolats de *S. typhi* il était trouvé inefficace. Cette résistance peut être due à la structure physiologique de la bactérie qui inclut la perméabilité de la paroi cellulaire (Adwan et al., 1996).

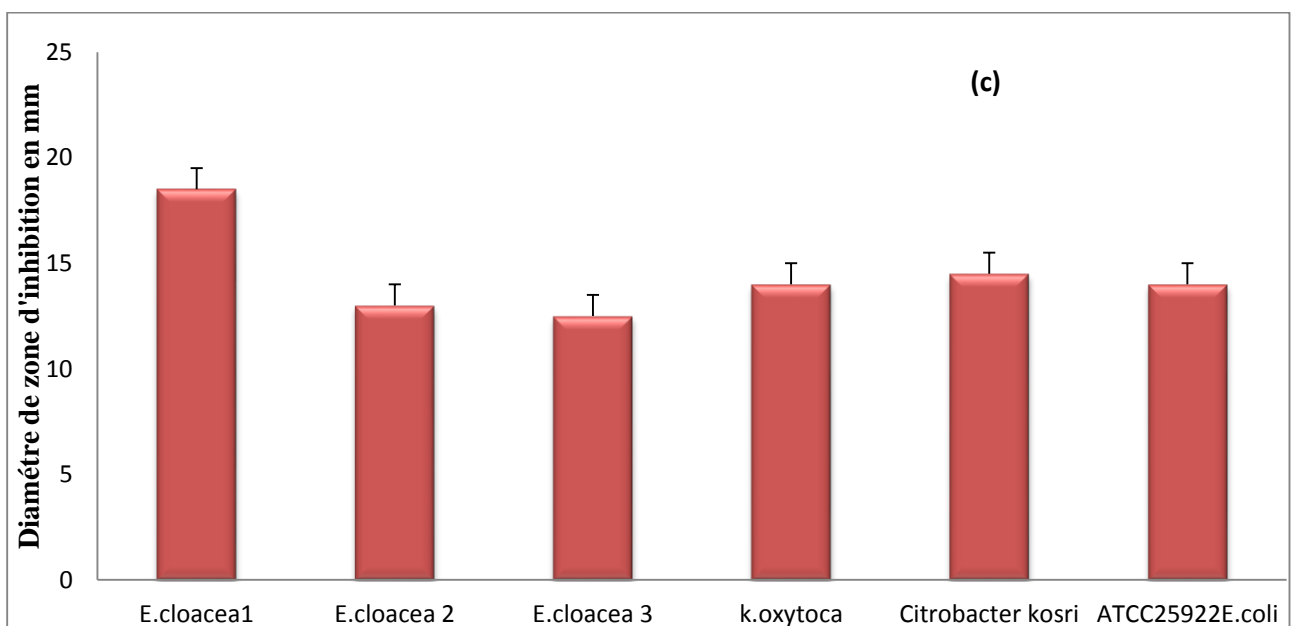
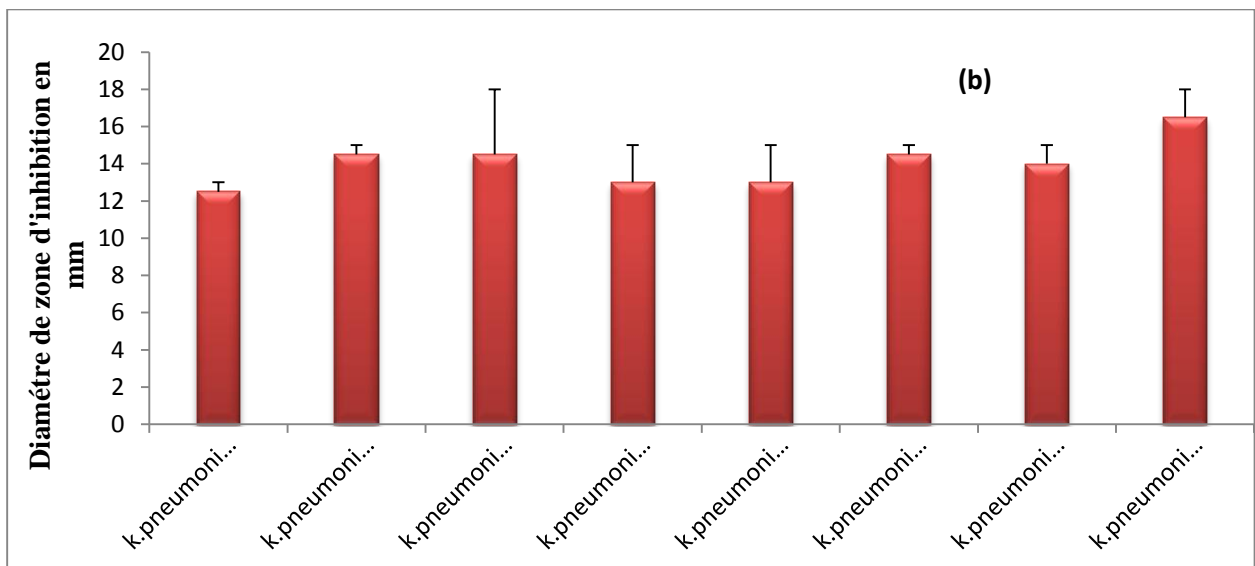
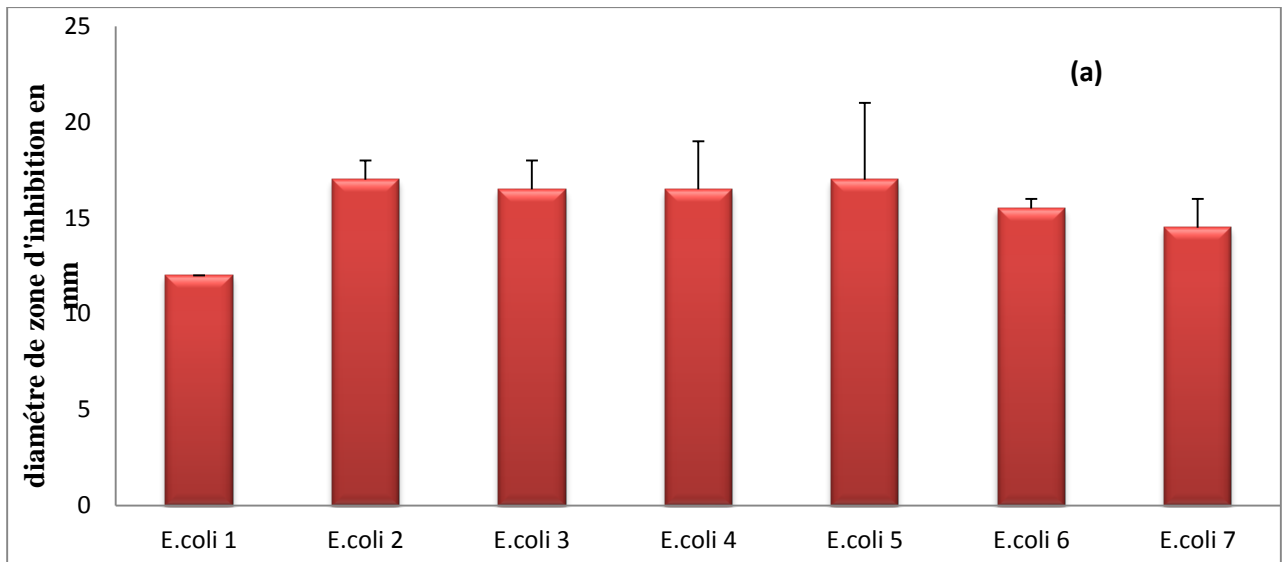


Figure 34 : Diamètre des zones d'inhibition de la croissance bactérienne des souches *E.coli* (a) *K.pneumoniae* (b) *E.cloacea* et les autres espèces (c) obtenus en présence des différents extraits.

Néanmoins nos résultats corroborent avec les résultats de (Debib et al., 2014) et ceux trouvés par Estherlydia et al., (2013) ou ils ont confirmé la sensibilité de microorganismes orales y compris *K. pneumoniae* vis-à-vis un d'un extrait de *P. granatum*. (Alya'a et al., 2014) ils ont aussi confirmé l'efficacité des extraits des *P. granatum* contre les bactéries tel que *K. pneumoniae* et *Streptococcus spp.* La différence dans les résultats pourrait être dû à la différence dans les procédés d'extraction utilisés par les différents groupes, ou en raison du fait que notre extrait été stocké qui a déstabilisé les composants actifs de l'extrait car ils sont instables.

Selon la littérature scientifique, l'activité antibactérienne des extraits de plantes est due aux différents agents chimiques présents dans ces extraits, y compris les flavonoïdes et les triterpénoïdes ainsi que d'autres composés de nature phénolique ou groupes hydroxyle libres, qui sont classifiés comme composés antibiotiques très actifs (Rojas et al., 1992 ; Marjorie, 1999).

La variation de la composition chimique de notre analyse HPLC explique donc les variations observées dans l'activité antimicrobienne des extraits. L'efficacité optimale d'un extrait peut ne pas être due à un constituant actif principal, mais à l'action combinée (synergie) de différents composés à l'origine de cet extrait (Essawi et Srour, 2000). Pour cela, la comparaison cas par cas de l'activité antimicrobienne de plusieurs extraits, en se basant sur le dosage d'un seul constituant actif (polyphénols dans notre cas), nous semble inutile.

Sur le plan quantitatif, le dosage colorimétrique avec le réactif de Folin-Ciocalteu a montré la richesse de nos extraits en polyphénols, donc on peut dire que l'activité antibactérienne de ces extraits est due, au moins partiellement, à la présence de ce type de composés chimiques actifs dans leur composition, surtout pour l'extrait aqueux polaire.

Les résultats révèlent des réponses variables en fonction des souches et de type de l'extrait testé. Plusieurs classes de polyphénols telles que les acides phénoliques, flavonoïdes et les tannins servent de mécanisme de défense des plantes contre les micro-organismes, les insectes, et les herbivores pathogènes (Falleh et al., 2008). Les Polyphénols, tels que les tannins et les flavonoïdes comme l'epigallocatechine, la catéchine, la myricétine, la quercétine, (Shan et al., 2007) et lutéoline (Askun et al., 2009) sont des substances antibactériennes importantes.

La richesse du *Punica granatum* en tannin (Gil *et al.*, 2000) et selon Cowan, (1999) à suggérer que les propriétés antimicrobiennes des tanins pourrait être liée à leur capacité à inactiver l'adhérence microbiennes, la synthèse de certains enzymes et protéines membranaires de microorganismes par leur complexité avec les polysaccharides, leur capacité de se fixer à des substrats tels que les sels minéraux, vitamines et glucides ce qui les rend indisponibles pour les micro-organismes (Stern *et al.*, 1996 ; Shahidi et Nacsik, 2004) et leur capacité à modifier la morphologie de micro-organismes..

D'autre part. Étant donné que les fractions de grenade contiennent un large éventail de flavonoïdes en particulier les anthocyanes (Seeram *et al.*, 2006) pourraient exercer des effets antibactériens puisqu'ils sont des puissants inhibiteurs in vitro de l'ADN gyrase (Milane, 2004) par deux mécanismes (Dadi *et al.* 2009) :

- ✚ Elle se fixe sur l'ADN au niveau des sites d'insertion de l'enzyme bloquant ainsi son activité.
- ✚ Elle bloque le site de fixation de l'ATP se trouvant sur l'ADN gyrase.

Dans les deux cas l'action des flavonoïdes se manifeste par le clivage de l'ADN bactérien, désormais incapable de subir les modifications topologiques nécessaires à son bon fonctionnement (Ulanowska *et al.*, 2006).

D'autre part, Le mécanisme de perturbation de la croissance est expliqué par l'action des composés phénoliques sur la membrane. Ces extraits vont entraîner une perte de perméabilité sélective de la membrane cellulaire par changement ces propriété physique et l'inhibition des enzymes extracellulaires microbiennes.

Le noyau phénolique est une structure très favorable à l'interaction avec les protéines, parmi les interactions on peut citer :

- ✓ Une liaison hydrogène avec des résidus polaires et des groupements peptidiques.
- ✓ Des interactions de dispersion avec les résidus d'acide aminés peu polaires.
- ✓ Inhibition du métabolisme microbien.
- ✓ Inhibition de la synthèse des acides nucléiques. (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

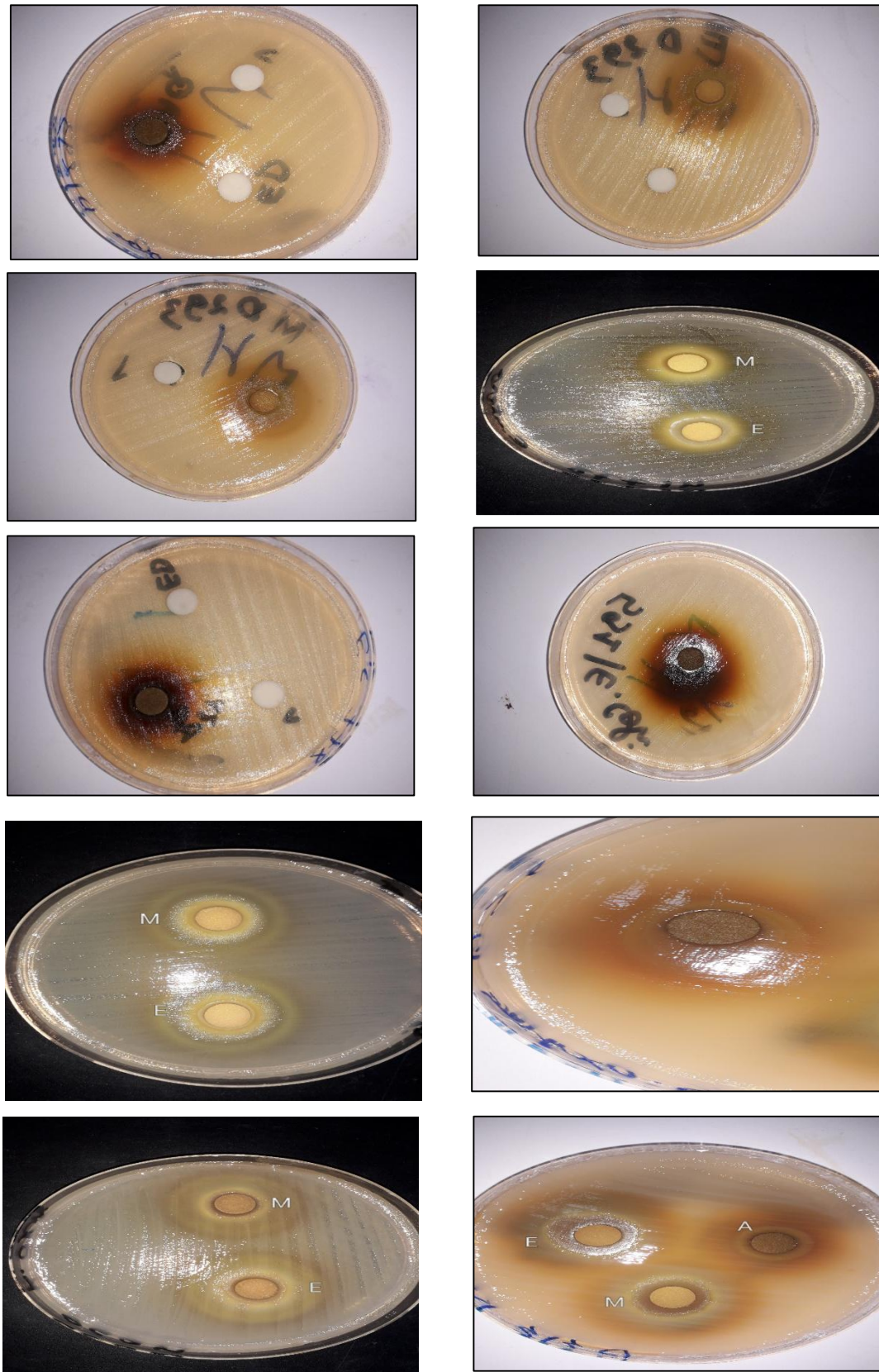


Figure 35 : Quelques résultats (zone d'inhibition) de l'effet antibactérien des extraits de la peau du fruit *Punica granatum*.

Conclusion et perspectives

De nos jours, l'utilisation des plantes médicinales en phytothérapie a reçu un grand intérêt dans la recherche biomédicale et devient aussi importante que la chimiothérapie. Ce regain d'intérêt vient d'une part du fait que les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances et de composés naturels bioactifs et d'autre part du besoin de la recherche d'une meilleure médication par une thérapie plus douce sans effets secondaires.

Les extraits naturels issus des plantes contiennent une variété de composés phénoliques et des huiles essentielles auxquelles on attribue un pouvoir inhibiteur des microorganismes

Dans le présent travail, nous nous sommes intéressés aux effets antibactériens des différents extraits de la peau du fruit de *Punica granatum* plante largement utilisée en médecine traditionnelle à travers le monde.

Du point de vue phytochimique, nous avons réalisé une extraction générale dont les rendements les plus élevés sont observés dans les extraits éthanolique (**59%**) et méthanolique (**58%**), suivi par l'extrait aqueux (**43%**).

Toutefois, *Punica granatum* révèle une immense richesse en composés polyphénoliques dans la peau de ce fruit particulièrement des extraits polaires issues par les solvants polaires (eau, méthanol et éthanol) avec des valeurs variant entre **76,625 à 275,062 mg EAG/100g** de grenade. Les classes identifiées dans nos extraits sont des acides phénoliques et des flavonoides.

Cependant, selon les résultats de l'aromatogramme, l'ensemble de nos extraits phénoliques ont prouvé un effet antibactérien sur quelques souches jugées d'être hyper-résistantes aux β -lactamines. Cet effet est bien marqué surtout par l'extrait éthanolique vis-à-vis *E.coli*, *C. koseri* et *E. cloacae*.

Globalement il apparaît que l'activité antimicrobienne de *Punica granatum* reste diversifié et variable en fonction des souches microbiennes testées, les extraits naturels et la partie dont ils sont issues.

Cette étude ouvre la voie à une plus grande attention à la recherche et l'identification des composés actifs responsables des activités de cette usine biologique. D'autres études devraient être menées pour élucider le mécanisme d'action exacte par lequel les extraits exercent surtout leur effet antibactérien.

La majorité des souches productrices des BLSE présentent des niveaux de résistance élevés à la plupart des β -lactamines sauf l'imipénème.

Une politique d'antibiothérapie justifiée et/ou d'une restriction dans la prescription des céphalosporines peut conduire à une diminution significative de la fréquence de BLSE.

Nos résultats préliminaires montrent que tous les extraits bruts testés témoignent d'activités antimicrobiennes in vitro. D'autres études approfondies sont nécessaires et se résument dans les points suivants :

- ✚ Partant du fait qu'une substance pouvant être très active in vitro, peut perdre cette activité une fois pénétrée dans le corps ; Une étude in vivo est souhaitable
- ✚ Evaluation d'autres effets biologiques in vitro comme in vivo des extraits bruts et de leurs composés actifs en utilisant différentes techniques.
- ✚ Une synergie entre les polyphénols et les antibiotiques.
- ✚ Une étude de l'activité anti-tumorale est souhaitable.



Liste des abréviations

µl : Microlitre.

ADH : Arginine déshydrogénase.

AmpC: Chromosomal located céphalosporinase.

APGII: Angiosperm Phylogeny Group II.

API20E : Analytical profile index 20E (E= Entérobactéries).

ATCC: American Type Culture Collection.

BHIB : Bouillon cœur-cerveau.

BLSE : β-Lactamase à Spectre Étendu.

BMR : Bactéries multi- résistantes.

C1G : Céphalosporine de première génération.

C2G : Céphalosporine de deuxième génération.

C3G : Céphalosporine de troisième génération.

Case: céphalosporinase.

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute.

CMI : Concentration minimale inhibitrice.

CTX-M : Céfotaximase-Munich.

E. cloacae : *Enterobacter cloacae*

E. coli : *Escherichia coli*.

E-BLSE : Entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu.

GEL : Gélatinase.

GN : Gélose nutritive.

GSC : Gélose au sang cuit.

GSF : Gélose au sang frais.

H₂S: hydrogène sulfite.

HPLC: High-Performance Liquid Chromatography.

K. oxytoca: *Klebseilla oxytoca*.

K. pneumoniae: *Klebseilla pneumoniae*.

LCR : Liquide CéphaloRachidien.

LDC : Lysine décarboxylase.

LPS: Lipopolysaccharides.

MALDI-TOF- MS: Matrix-Assisted Laser Desorption and Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry method.

ODC: Ornithine décarboxylase.

ONPG: Ortho-Nitro-Phenyl-β.D.Galactosidase.

OXA : oxacillinase.

PLP : Protéines Liant la Pénicilline.

SHV : Sulfhydryl variable.

SXT : Sulfamides + Triméthoprime.

TEM : D'après Temoniera : nom du malade chez qui la première souche a été isolée.

TFA : Acide TriFluorocétique.

VP : Réaction de Voges-Proskauer.



Glossaire

Calice : est formé de 4 à 8 sépales courts, charnus, épais, d'une belle couleur rouge vif, persistants, d'abord dressés puis étalés après la fécondation. Ces sépales présentent une préfloraison valvaire.

Drupe: En botanique, une **drupe** (du latin *drūpa oliva*, *olive mûre*, lui-même tiré du grec *δρῦπτα*, *olive trop mûre*) est un fruit indéhiscent, charnu à noyau, comme la cerise, l'abricot ou l'olive. Il est issu d'un pistil à carpelle unique, du type « infère » non adhérent. Dans le cas de fleurs à plusieurs carpelles libres, on obtient un fruit composé ou polydrupe, telle la mûre de la ronce. Il est en général indéhiscent (bien que la déhiscence ne soit pas nécessaire dans le cas d'un fruit charnu dont la chair se décompose rapidement, libérant le noyau).

Ethanobotaniques : L'ethnobotanique, contraction d'ethnologie et de botanique, est l'étude des relations entre l'Homme et les plantes. Son domaine d'étude implique une large gamme de disciplines depuis les recherches archéologiques sur les civilisations anciennes jusqu'à la bio-ingénierie de nouvelles cultures comme le blé (**Pierre, 2006**).

L'antigène de Kunin : Un antigène commun dénommé ECA (pour Enterobacterial Common Antigen) ou antigène de Kunin. Cet antigène n'existe que chez les entérobactéries et, de ce fait, a un intérêt taxonomique. Sa présence chez les *Yersinia* a permis d'inclure ce genre dans la famille des entérobactéries (**Delarras, 2010**).

Leucorrhées : une leucorrhée est un écoulement non sanglant provenant de l'appareil génital féminin (vagin). (**Bohbot, 2008**).

Péricarpe: En botanique, le **péricarpe** est l'enveloppe de la graine d'un fruit à noyau, une drupe, ou à pépins; il se compose de l'ovaire fécondé. En botanique fruitière, le péricarpe désigne l'enveloppe du fruit, provenant du développement des parois du carpelle ; il est la partie comestible d'un fruit.

Le péricarpe est divisé en trois couches, qui de l'extérieur vers l'intérieur, sont: l'épicarpe (la peau) qui est habituellement une mince couche durcie de couleur bien que généralement pas ligneuse; cette couche est encore nommée l'exocarpe, le mésocarpe (la chair) qui est habituellement construit par de nombreuses grandes cellules et constitue une partie succulente du fruit, l'endocarpe qui peut avoir une consistance similaire à celle de mésocarpe ou durcir beaucoup.

Introduction

Chapitre I :

Etude bibliographique

Chapitre II

Matériel et méthodes

Chapitre *III*

Résultats et discussion

Conclusion

Références bibliographiques

Annexe

1- *Punica granatum*

1- 1-Historique et usages

Punica granatum (**grenade**) est l'un des plus anciens fruits comestibles connus. Il a été largement utilisé dans la médecine traditionnelle en Amérique, en Asie, en Afrique et en Europe pour le traitement de différents types de maladies. En plus de ses usages historiques anciens, la grenade est utilisée dans plusieurs systèmes de médecine pour une variété de maux (**Turk et al., 2008**).

D'après **Dioscoride**, médecin grec auteur de « De Materia Medica », si l'on mange trois fleurs de grenadier, même de petite taille, on ne souffrira pas des yeux de toute l'année (**Ducourthial, 2003**).

Hippocrate recommandait la grenade contre les leucorrhées, pour favoriser « l'écoulement rouge » chez les femmes, pour « faire concevoir », pour soigner un œil qui pleure et qui est douloureux, et pour beaucoup d'autres maux (**Benzi, 1999**).

Ce fruit est mentionné dans le livre sacré du coran comme de nombreuses plantes comestibles et non comestibles sont cités et en faire un fruit du paradis, et la science moderne est venue pour nous révéler quelques-uns des secrets de ce fruit étonnant et de ses avantages, Qui suscité l'intérêt de nombreux chercheurs (**Ajaikumar, 2005**).

1- 2- Description botanique

Le grenadier est un petit arbre à port arbustif des régions méditerranéennes qui peut atteindre 6 m de haut. Ses fleurs rouge vif mesurent 3 cm de diamètre. Ses fruits, les grenades, contiennent en moyenne 600 graines pulpeuses. La grenade est une grosse baie ronde, de la taille d'une grosse orange, à écorce dure et coriace, de couleur rouge ou jaune beige, qui renferme de nombreux pépins de couleur rose à rouge. Seuls ses pépins sont comestibles, soit environ la moitié du fruit. Dans chaque pépin, la graine est enrobée d'une pulpe gélatineuse de chair rouge transparente, sucrée chez les variétés améliorées, sinon d'un goût plutôt âcre (**Benoît Bock, 2013**).

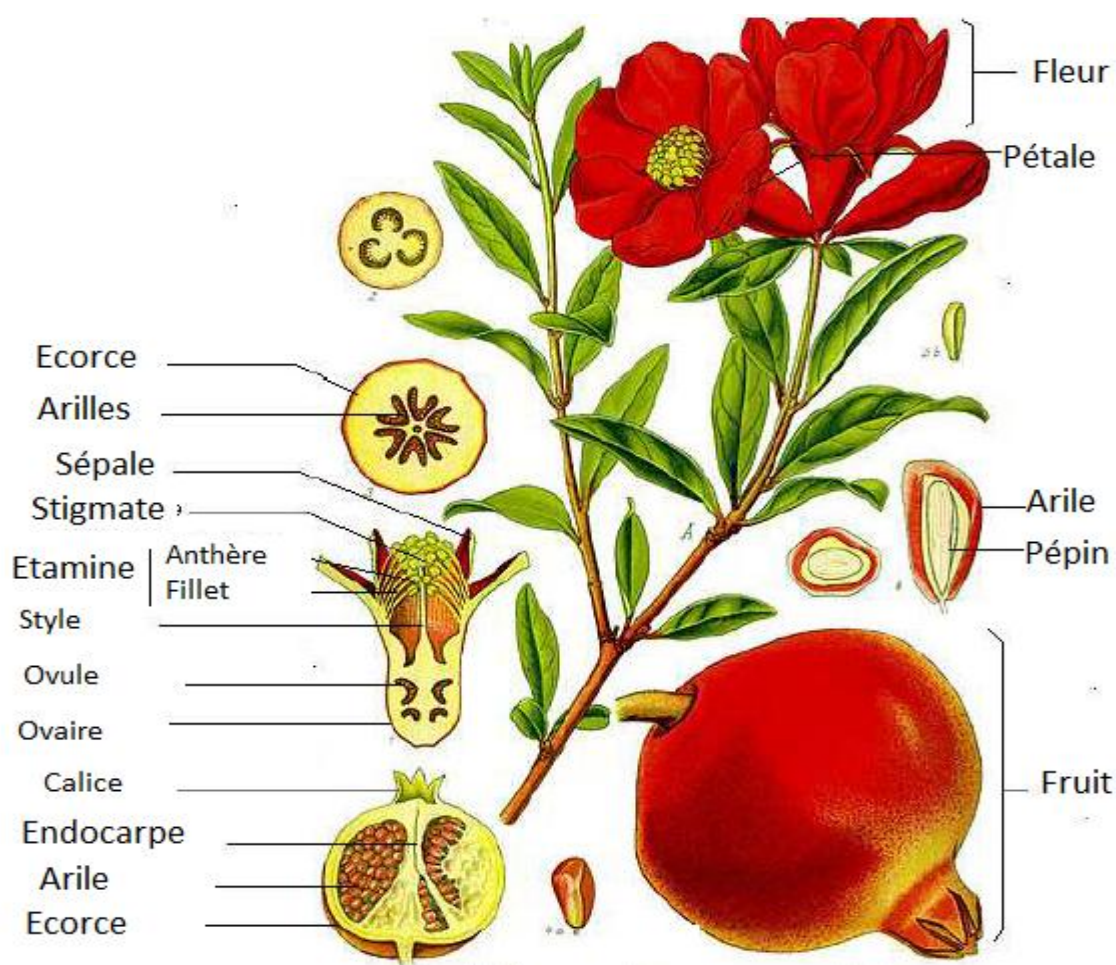


Figure 01 : Fleurs et fruits du Grenadier (*Punica granatum*) (Flora von Deutschland and Schweiz. 2008).

A. Les feuilles

Le Grenadier possède un feuillage pérenne constitué par des feuilles opposées, lancéolées rigides et coriaces, elles sont luisantes, de 3 à 7 cm de long sur 2 cm de large selon les cultivars (Bridel et al., 2004). Au stade juvénile, les feuilles sont de couleur rougeâtre puis à la maturité, elles deviennent verdâtres (Hollande et al., 2009).

B. Les fleurs

Les fleurs du grenadier sont d'un rouge éclatant ou grenat selon les variétés mesurent 3 cm de diamètre et d'une longueur de 3.8 à 5 cm. Elles se trouvent soit, solitaire à l'aisselle des feuilles ou réunies par groupe de deux ou trois au sommet des branches (Nizamul et al., 2015).

C. Les fruits

Le fruit du grenadier, la grenade, est une drupe sphérique d'environ 12 cm de large alors que le poids varie entre 200 et 650 grammes, couronnée par un calice persistant (Holland et al., 2009).

Le péricarpe du fruit est une coque épaisse, de consistance dure, de saveur amère et astringente. Il est très coloré, généralement de teinte orange-marron à rougeâtre, tandis que l'intérieur est rempli de graines enchâssées dans une gangue jaunâtre et enveloppées par une pulpe rose comestible, très juteuse, au goût acidulé et doux à la fois (Lhoste, 1989).

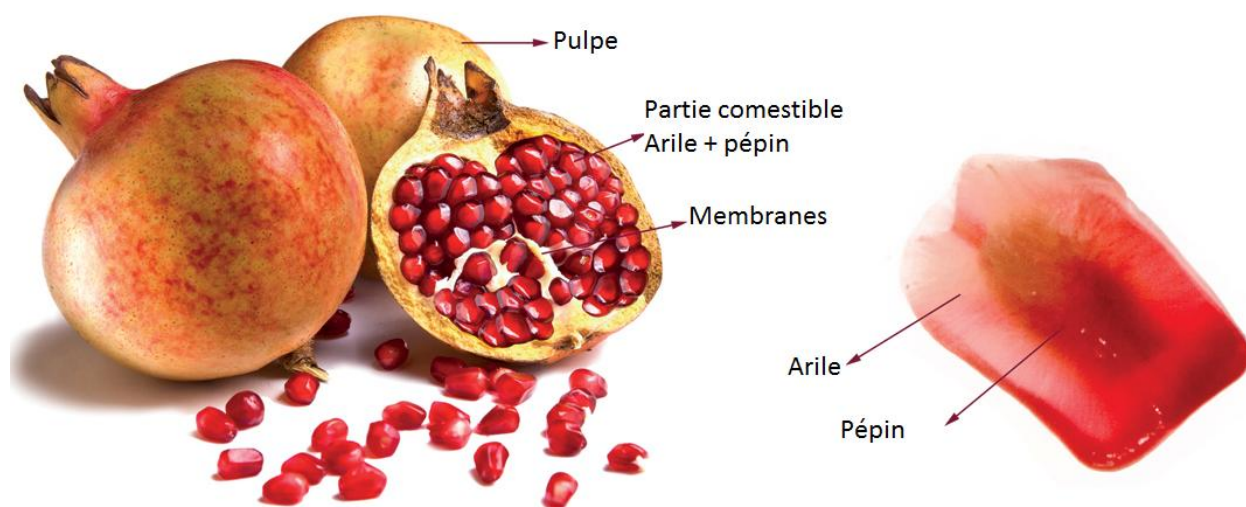


Figure 02 : Structure du fruit *Punica granatum*

D. Ecorce

D'après (Planchon et Collin, 1875 ; Nizamul et al., 2015). L'écorce du fruit du grenadier est également appelée *malicorium*. Il s'agit de la partie dure du fruit, irrégulière, et coriace. Plutôt épaisse de (2-3) mm de couleur rouge ou jaune beige chez certaines variétés,

Elle est généralement utilisée séchée, sous la forme de morceaux brunâtres ou vert rougeâtre à l'extérieur, un peu verruqueux, brillants, jaunâtres sur la face intérieure concave, portant souvent l'empreinte des graines qui y étaient appliquées. Cependant, un goût vraiment astringent et faiblement amer. (Nizamul et al., 2015).

1- 3-Nomenclature

Le grenadier a d'abord été connu sous deux appellations latines ; *Malum granatum*, qui signifie pomme à graines et *Malum punicum* qui signifie pomme de Phénicie. Linnaeus a appelé plus tard le grenadier « *Punica granatum* ». Le nom conserve encore un dérivé du mot **Punica** se référant à la ville de Carthage, ancienne ville dans la banlieue nord de la Tunisie. Et celui spécifique **granatum**, qui signifie granuleux faisant référence à la multiplicité des grains contenus dans le fruit (**Richarde et al., 2006 ; Wald, 2009**).

- **Nom scientifique** : *Punica granatum*
- **Nom français** : grenadier
- **Nom anglais** : pomegranate
- **Nom espagnol** : Granada
- **Nom italien** : Melograno
- **Nom arabe** : Romane

1- 4-Classification

Le grenadier, *Punica granatum*, a été décrit par Linné et introduit dans sa classification en 1753. Telle est cette classification :

- o **Embranchement** : Spermaphytes
- o **Sous-embranchement** : Angiospermes
- o **Classe** : Magnoliopsida
- o **Ordre** : Myrtales
- o **Famille** : Punicaceae
- o **Genre** : *Punica*
- o **Espèce** : *Punica granatum*

En 1998, une nouvelle classification des angiospermes, c'est-à-dire des plantes à graines, est créée par un groupe de botanistes, l'*Angiosperm Phylogeny Group* ou **APG**. Cette classification phylogénétique réorganise le règne végétal en fonction de critères moléculaires, s'intéressant essentiellement à l'ADN de deux gènes chloroplastiques et d'un gène nucléaire de ribosome (**Spichiger et Savolainen et al., 2004**).

Cette classification a été révisée en 2003, donnant naissance à la classification phylogénétique APGII, qui comporte 457 familles réparties dans 45 ordres. Au sein de cette classification, la position du grenadier est :

- o **Clade** : Angiospermes
- o **Clade** : Dicotylédones vraies
- o **Clade** : Rosidées
- o **Ordre** : Myrtales
- o **Famille** : Lythraceae
- o **Genre** : *Punica*
- o **Espèce** : *Punica granatum* (Spichiger et Savolainen et al., 2004)

1-5- Composition chimique

Le fruit de grenade se compose de trois parties : les graines, le jus, et les écorces (**Lansky et Newman, 2007**). La partie comestible du fruit de grenade (50 à 52%) se compose 80% des arilles (jus) et 20% des graines. Les arilles contiennent 85% eau, 10% sucres totaux, principalement fructose et glucose, et 1.5% pectine, acides organiques tels que l'acide ascorbique, l'acide citrique, et l'acide malique, et les composés bioactifs tels que les composés phénoliques et les anthocyanines, du potassium, du phosphore et des minéraux, ainsi que diverses vitamines dont une forte teneur en vitamine C : 20 mg pour 100g (**Viuda-Martos et al., 2010**).

L'écorce du fruit contient deux importants acides hydroxybenzoïques, l'acide gallique et l'acide éllagique. Elle renferme également des acides hydroxycinnamiques, des dérivés de flavones, des molécules de coloration jaune et des anthocyanidines, responsables de la couleur rouge des grenades. De nombreux ellagitanins sont aussi présents, tels que la punicaline, la punicalagine, la granatine A et la granatine B (**Lansky et al., 2007**). Ces tanins représentent jusqu'à 28% de l'épiderme du fruit (**Fournier, 1948**).

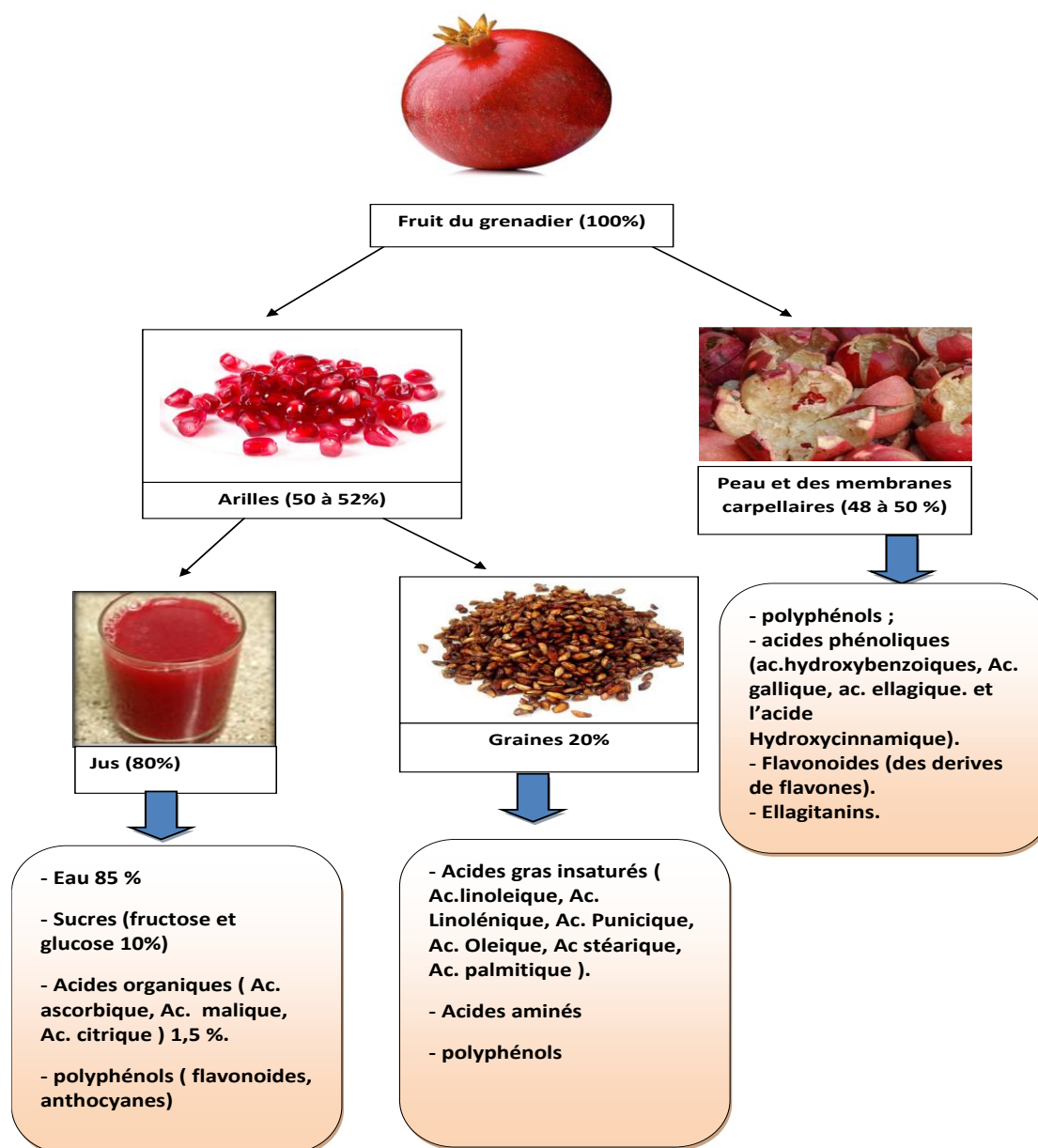


Figure 03 : Présentation schématique des différentes parties du fruit de grenade et leur composition.

1- 6-Principaux composés phénoliques du fruit *Punica granatum*

L'étude phytochimique de *Punica granatum* L. révèle sa richesse en polyphénols : (tanins, flavonoïdes, anthocyanes ...) et d'autres composés tels que les alcaloïdes ainsi que la présence des sucres (10%), des acides organiques (1,5%), des acides aminés, des stéroïdes, et des sels minéraux selon la partie de la plante (Gil et al., 2000 ; Kim et al., 2002).

1-6-1- Tanins

Les tanins hydrolysables de structures diverses comprenant les éllagitanins et les gallotanins constituent les composés les plus prédominants dans les diverses parties de la grenade. Les tanins condensés, cependant, sont rarement trouvés dans cette plante (**Wang et al., 2010**).

La punicalagine, ellagitanin complexe, caractéristique de la peau de grenade, est formé d'un glucose lié à l'acide ellagique et à l'acide gallagique. Elle est extraite dans le jus de grenade à partir de la peau pendant la transformation de jus et qui est responsable de plus de 50% de l'activité antioxydante de grenade (**Adams et al., 2006**).

1-6-2- Flavonoïdes

Les flavonoïdes isolés à partir de la grenade incluent les flavones, les flavonols, les anthocyanidines et flavan-3-ols. Les couleurs brillantes du péricarpe et du jus sont attribuées aux anthocyanidines et aux flavan-3-ols, dont la teneur diminue ou augmente avec de la période de la maturation (**Wang et al., 2010**).

Les anthocyanidines rapportées dans la grenade sont habituellement présentes sous forme de glucoside avec des aglycons de delphinidine, de cyanidine et de pelargonidine, alors que les flavan-3-ols trouvés dans cette plante sont seulement présents sous la forme déglucosylée comprenant la catéchine, l'épicatéchine, l'epigallo-catéchine et leurs dérivés. Les flavones et les flavonols constituent les principales flavonoïdes du péricarpe, qui existent fréquemment comme glucosides avec des aglycons de lutéoline, de kaempferol, de quercétine, d'apigénine et de naringine (**Wang et al., 2010**).

1-6-3-Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont principalement trouvés dans l'écorce de la tige et de la racine aussi bien que dans le jus de grenade. Il y a principalement deux genres d'alcaloïdes comprenant les pipéridines et les pyrrolidines rapportées dans cette plante.

Habituellement, les pipéridines ont un squelette d'anneau de six-membres et les pyrrolidines ont un squelette d'anneau de cinq-membres. Les espèces et le contenu des pipéridines sont relativement plus importants que ceux des pyrrolidines (**Wang et al., 2010**).

1- 7- Activités thérapeutiques de l'écorce de *Punica granatum* L.

1- 7-1- Propriété antimicrobienne

Reddy et al., (2007) ont démontré que les différents extraits de grenade préparés dans différents solvants (eau, éthanol, méthanol) présentent une activité antimicrobienne significative contre plusieurs souches telles que *Candidat albicans*, *E.coli*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Choi et al., (2009) quant à eux ont étudié l'effet *in vitro* et *in vivo* de l'application de différentes concentrations de l'extrait d'écorce de grenadier pour inhiber la croissance de Salmonelle. Ils ont constaté que la dose minimale était de 62.5mg /L.

En général, le fort pouvoir inhibiteur de *Punica granatum*L. est dû à la concentration élevée en composés bioactifs tels que les polyphénols, les tanins et les flavonoïdes qui possèdent la capacité d'inhibition de l'activité des micro-organismes provoquant la détérioration des aliments (**Navarro et al., 2011**).

1- 7- 2- Propriétés antioxydantes, anticancéreuse, antidiabétique (voir Annexe II).

2 - les entérobactéries

La famille des Enterobacteriaceae est composée d'agents infectieux d'importance majeure. Elle regroupe un grand nombre d'espèces largement impliquées dans les infections notamment les septicémies, les infections nosocomiales ; les méningites....etc., qui ont été grandissantes ces dernières années, pouvant quelques fois causer des problèmes thérapeutiques (**Jakob, 2011**).

Les entérobactéries constituent plus de 80% des germes isolés en laboratoire : *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Morganella* et *Yersinia* (**Eisenstein et al., 2000**) sont souvent rencontrés dans les prélèvements d'origine diverse, mais particulièrement dans les urines et les prélèvements sanguins (**Farmer et Kelly, 1990**) (Voir Annexe II).

3- Les bêta-lactamines

3-1- Historique

En 1928, Fleming (1881-1955), professeur de bactériologie à Londres, observa sur une boîte de Pétri, qui contenait une culture de staphylocoques et qui avait été contaminée accidentellement par une moisissure, que les colonies de staphylocoques situées à proximité de la moisissure avaient été lysées (**Figure 04**). Il identifia cette moisissure comme étant un *Penicillium* et réussit à préparer un « jus de moisissure » qu'il appela pénicilline. Ce n'est qu'en 1940 qu'une équipe de chercheurs d'Oxford, Florey, Chain et Heatley, réussit à obtenir une pénicilline concentrée, partiellement purifiée et stable (**Cavallo et al., 2004**).

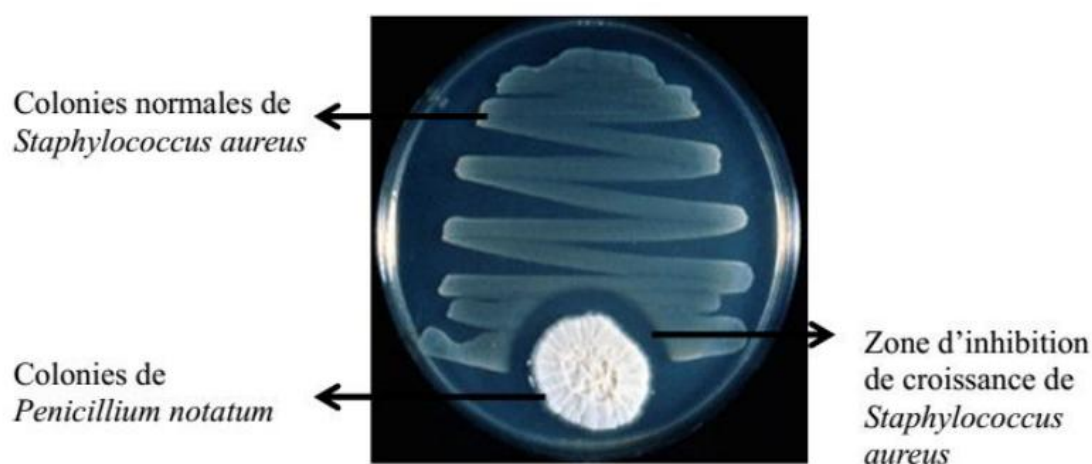


Figure 04 : Inhibition de la croissance d'une culture de *Staphylococcus aureus* par la Moisissure *Penicillium notatum* (**Prescott et al.,2013**).

3-2 Définition des β -lactamines

Les β -lactamines sont les antibiotiques les plus utilisés dans la pratique clinique courante (**Rodriguez-Villalobos et Struelens, 2006**) surtout dans le traitement des infections dues aux entérobactéries (**Zogheib et Dupont, 2005**). La famille des β -lactamines comprend un grand nombre de molécules, toutes caractérisées par la présence d'un cycle β -lactame indispensable à l'activité antibiotique, une faible toxicité, associées à un mode d'action fort complexe sur des protéines de la membrane cytoplasmique, dénommées Protéines Liant la Pénicilline (PLP) ou Penicillin Binding Proteins (**Cavallo et al., 2004**).

3-3 Structure

Les β -lactamines ont en commun une structure appelée l'anneau β -lactame, qui est formé de quatre membres : trois atomes de carbone et un atome d'azote. Cet anneau constitue la portion responsable de l'activité de ces molécules (Fisher et al., 2005) (Figure 05).

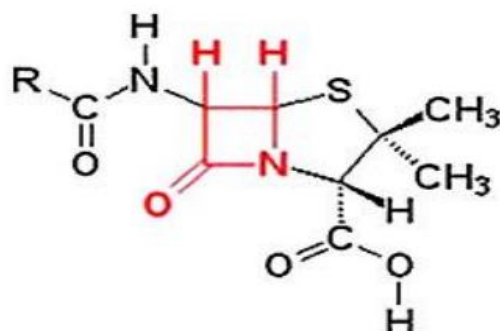


Figure 05 : Structure générale des bêta-lactamines (Ruppé, 2010).

3-4 Classification des β -lactamines

Les β -lactamines, qu'elles soient naturelles ou produites par hémisynthèse, sont classées en fonction de la nature du noyau entrant dans leur structure de base (Cavallo et al., 2004).

➤ Les pénicillines

Leur noyau de base associe un cycle β -lactame à un cycle thiazolidine, spécifique des pénicillines (Cavallo et al., 2004). Selon la nature de ses différents substituants, on a défini plusieurs sous-classes, dont les plus utilisées sont les aminopénicillines (ampicilline, amoxicilline), les carboxypénicillines (ticarcilline) et les uréidopénicillines (pipéracilline). Le pivmécillinam (prodrogue du mécillinam) est une amidinopénicilline indiquée dans le traitement des infections urinaires (Ruppé, 2010).

➤ Les céphalosporines

Leur noyau de base associe un cycle β -lactame à un cycle dihydrothiazine pour former l'acide 7-aminocéphalosporanique ou 7-ACA (noyau céphème), qui distingue les céphalosporines des pénicillines (Cavallo et al., 2004). On les classe en trois, voire quatre générations :

1. Les céphalosporines de première génération (C1G : céfalotine, céfalexine) sont plutôt actives sur les bactéries à Gram positif.

2. Les **C2G** (céfuroxime, céfamandole) ont un spectre étendu vers les bactéries à Gram négatif.
3. Les **C3G** ou oxyimino-céphalosporines (céfixime, céfotaxime, ceftazidime) ont un spectre étendu à la plupart des entérobactéries et sur *P.aeruginosa* pour la ceftazidime. Les C3G sont les antibiotiques de choix dans le traitement des infections sévères à entérobactéries.
4. Les **C4G** (céfépime et ceftazidime) sont des oxyimino-céphalosporines zwitterioniques relativement stables à l'hydrolyse des céphalosporinases de type AmpC (**Ruppé, 2010**).

➤ **Les carbapénèmes**

Les carbapénèmes, dérivés de la thiénamycine, ont un spectre très large et sont très stables à l'hydrolyse de la plupart des β -lactamases. Les molécules disponibles sont l'imipénème (en association avec la cilastatine, qui inhibe la dégradation rénale de l'imipénème), l'ertapénème et le méropénème. Le doripénème est le dernier carbapénème mis sur le marché en Europe (**Ruppé, 2010**). Ces antibiotiques sont actifs vis-à-vis de très nombreuses espèces de bacilles Gram négatif dont les entérobactéries, *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii*.

Seule l'ertapénème n'est active que sur les entérobactéries (**Nordmann et Carrer, 2010**).

➤ **Les monobactames**

Ce sont des β -lactamines monocycliques, initialement découvertes dans des surnageants de culture de bactéries plutôt que de levures ou champignons comme dans le cas des autres β -lactamines (**Ruppé, 2010**). Seul l'aztréonam est à l'heure actuelle prescrit (**Cavallo et al., 2004**), ce dernier n'est actif que sur les bactéries à Gram négatif (**Ruppé, 2010**).

➤ **Les inhibiteurs des β -lactamases**

Ce sont des β -lactamines de forte affinité pour certaines β -lactamases, mais qui ont une faible activité antibactérienne intrinsèque à l'exception de la bonne activité du sulbactam sur *Acinetobacter baumannii*. L'acide clavulanique est utilisé avec l'amoxicilline dans l'Augmentin[®] et la ticarcilline dans le Claventin[®], alors que le tazobactam est utilisé avec la pipéracilline dans la Tazocilline[®] (**Ruppé, 2010**).

3-5- Mode d'action des β -lactamines

Chaque antibiotique exerce son action biochimique en modifiant une réaction particulière du métabolisme bactérien (**François Jehl, 2012**).

Toutes les β -lactamines ont le même mécanisme d'action : elles bloquent la synthèse du peptidoglycane (ou mucopeptide, ou muréine), qui est le polymère majeur spécifique de la paroi des bactéries à Gram négatif et à Gram positif. Ce blocage intervient par inhibition de certaines enzymes responsables de la transpeptidation, étape essentielle de la synthèse du peptidoglycane. Ces enzymes, collectivement appelées PLP, sont insérées dans la partie externe de la membrane cytoplasmique bactérienne. Pour être actives, les β -lactamines vont devoir atteindre leur cible en pénétrant dans la paroi bactérienne et se fixer sur les PLP, ce qui aboutit à l'inactivation du site actif de l'enzyme, provoquant une inhibition de la synthèse du peptidoglycane et l'arrêt de la croissance bactérienne. La fixation est irréversible et l'antibiotique se comporte comme un substrat suicide (Cavallo et al., 2004) (Figure 06).

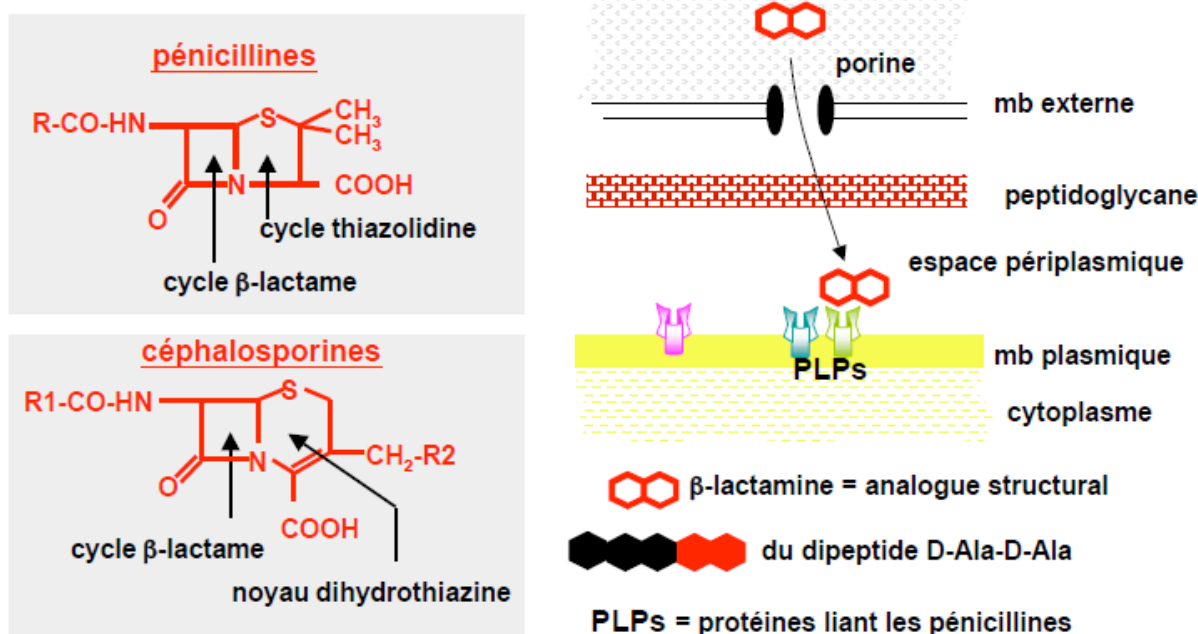


Figure 06 : Mode d'action des β -lactamines (Verdet, 2011).

3-6- Mécanismes de résistance aux β -lactamines

De manière générale, les entérobactéries utilisent différents mécanismes pour développer une résistance aux β -lactamines : il peut s'agir de troubles de perméabilité pour les antibiotiques, ce qui empêche la pénétration de l'antibiotique dans la bactérie, de systèmes d'efflux qui permettent d'évacuer les antibiotiques qui auraient pénétré dans la bactérie, ou de modification de la cible bactérienne de l'antibiotique (exemples : les sites de liaison des pénicillines, les penicillin binding proteins (PBP), ce qui empêche la fabrication de la paroi de la bactérie). Mais le plus fréquemment, il s'agit d'enzymes détruisant les β -lactamines, les β -lactamases (Vora et Auckenthaler, 2009).

3-6-1 Mécanismes non enzymatiques

- **Imperméabilité de la membrane externe** : L'altération des porines par mutation est à l'origine de résistances acquises aux β -lactamines, soit par une modification structurale d'une des porines essentielles, ce qui a été décrit chez *E. coli*, soit par une diminution quantitative des porines, qui est la situation la plus fréquente (**Cavallo et al., 2004**).
- **L'hyper-expression des systèmes d'efflux** : Le second mécanisme non enzymatique est la sélection d'une mutation qui aboutit à une hyper-expression d'un système d'efflux actif (**Cavallo et al., 2004**), cet efflux conduit à une diminution de la concentration intracellulaire de l'antibiotique (**Lozniewski et al., 2010**). (ex. résistance à l'imipénème causée par la surproduction d'AmpC pouvant être associée à des pertes de porines de la membrane externe et/ou la surexpression des pompes à efflux) (**Penteado et al., 2009**).

➤ **Modification des PLP**

L'efficacité des β -lactamines est liée à leur capacité de se fixer aux PLP. La liaison (antibiotique/ cible) est liée à la structure de cible. Diverses mutations peuvent entraîner des modifications diminuant l'efficacité de l'antibiotique. Le peptidoglycane est formé de longues molécules de polysaccharides (glycanes) qui sont réticulées par de courtes chaînes peptidiques. Lorsque le peptidoglycane n'est pas réticulé, les PLP ne sont pas affectées par les antibiotiques β -lactames (**De Wals, 2007**).

C'est le principal mécanisme pour les staphylocoques résistants à la méthicilline et pour les pneumocoques résistants à la pénicilline (**Neftel et al., 2000**). Cependant, ce type de mécanisme de résistance reste très rare chez les entérobactéries (**Belmeddah et Bentassa, 2012**).

3-6-2- Mécanismes enzymatiques : Production de β -lactamases

Les β -lactamases constituent toujours le principal mécanisme de la résistance naturelle et acquise aux β -lactamines, en particulier chez les bactéries à Gram négatif (**Philippon et Arlet, 2006**).

4- Anti-bio résistance

4-1- La résistance bactérienne

Selon la définition microbiologique du terme, une souche est dite résistante lorsqu'elle se cultive en présence de concentration plus élevée en antibiotique comparativement à d'autres souches qui lui sont phylogénétiquement liées (**Muylaert et Mainil, 2012**). Chez les entérobactéries, la résistance aux céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G) peut être due à l'hyperproduction de céphalosporinase chromosomique (AmpC), à l'acquisition plasmidique d'une céphalosporinase (e.g. CMY) ou d'une BLSE (e.g. TEM, SHV, CTX-M) (Cattoir, 2013).

4-2 Types de résistance

La résistance d'une souche bactérienne à un antibiotique peut être :

4-2-1 Résistance naturelle

La résistance naturelle ou intrinsèque est un caractère d'espèce qui touche toutes les bactéries de l'espèce considérée. Elle est stable, transmise à la descendance (elle a pour support génétique le chromosome bactérien) mais elle n'est pas ou peu transmissible sur un mode horizontal (d'une bactérie à l'autre au sein d'une même espèce ou entre espèces différentes) (**Lozniewski et al., 2010**). Beaucoup de bactéries à Gram négatif produisent à l'état naturel des β -lactamases constitutives codées par un gène chromosomique.

Ces enzymes, produites chez les souches sauvages à des niveaux variables suivant les espèces, contribuent à définir les phénotypes de résistance naturelle aux β -lactamines chez les souches sauvages (**Cavallo et al., 2004**).

4-2-2 Résistance acquise

Il s'agit d'un caractère qui ne concerne alors que quelques (ou parfois de nombreuses) souches d'une espèce donnée. La résistance acquise est moins stable, mais elle se propage souvent de façon importante dans le monde bactérien. La résistance acquise résulte d'une modification du capital génétique de la bactérie (**Lozniewski et al., 2010**), à savoir, les mutations responsables des résistances endogènes, et l'acquisition horizontale de matériel génétique étranger responsable des résistances exogènes (**Muylaert et Mainil, 2012**), permettant ainsi de tolérer une concentration d'antibiotique plus élevée que celle qui inhibe les souches sensibles de la même espèce (**Lozniewski et al., 2010**).

4-3 L'émergence de la résistance bactérienne chez les entérobactéries

La résistance des entérobactéries aux antibiotiques connaît une évolution mondiale préoccupante avec un impact croissant des β -lactamases qui se caractérise soit par production de β -lactamases à spectre étendu (BLSE), soit par production de carbapénèmase. **(Poirel et al., 2007 ; Livermore, 2009).**

L'une des particularités concernant l'épidémiologie de la résistance aux antibiotiques chez les entérobactéries est la rapidité de l'extension de sa prévalence **(Kumarasamy et al., 2010)** qui revient à la diffusion des plasmides et/ou d'autres éléments génétiques mobiles.

4-4- Les facteurs de l'émergence

Plusieurs études ont été effectuées ont souvent montré le rôle prépondérant des antibiotiques et le lien de causalité de l'utilisation de ces derniers et l'émergence des BLSE **(Mirabaud, 2003).**

❖ Le premier facteur qu'on peut relever concerne l'utilisation des antibiotiques de types céphalosporines de 3^{ème} génération.

En effet, les antibiotiques agissent à plusieurs niveaux : ils peuvent exercer une pression de sélection non-négligeable, et cette pression est d'autant plus marquée que le nombre de patients traités est important et que la durée de l'antibiothérapie est longue **(Mirabaud, 2003).**

❖ Le deuxième facteur de risque concerne la dissémination des souches résistantes qui englobe d'une part le problème des réservoirs (Tube digestif) et d'autre part le problème de transmission **(Goldstein et al., 1995).**

❖ Il existe d'autres facteurs de risque qui ont été identifiés chez les patients ayant subi hospitalisation prolongée, chirurgie abdominale, cathétérisme IV, sondage urinaire, ventilation assistée, hémodialyse ou utilisation de céphalosporines/ aminosides.

❖ Toutefois, la consommation des produits alimentaires, des animaux ayant consommé les antibiotiques et la fréquentation des patients hospitalisés devraient être explorés **(Bradford, 2001 ; Paterson et Bonomo, 2005).**

5-Les bêta-lactamase à spectre étendu (BLSE)

L'émergence des bactéries multirésistantes (BMR) est un enjeu majeur de la santé publique au niveau mondial. Parmi ces bactéries, les plus fréquemment rencontrées actuellement sont les entérobactéries (Vora et Auckenthaler, 2009).

Les bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE) constituent une grande famille très hétérogène d'enzymes bactériennes qui inactivent la plupart des bêta-lactamines à l'exception des céphamycines et des carbapénèmes (Vora et Auckenthaler, 2009).

De nombreuses BLSE naturelles ont été décrites, classées en 11 familles dont 4 d'entre elles sont majeures et représentées par les enzymes de type TEM, SHV, CTX-M et OXA.

Ces dernières années, les «nouvelles» BLSE, notamment les CTX-M, ont émergé de façon explosive chez les entérobactéries et la situation épidémiologique a complètement changé au niveau mondial (Vora et Auckenthaler, 2009).

5-1-Les entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu

Chez les entérobactéries, le mécanisme de résistance prédominant est l'inactivation enzymatique notamment la production de bêta-lactamases.

Les bêta-lactamases à spectre étendu sont une grande famille très hétérogène d'enzymes bactériennes découverte dans les années 80, ce sont des enzymes, constitutionnelles ou acquises, sécrétées par les entérobactéries qui leur confèrent une résistance à la plupart des bêta-lactamines.

Les bêta-lactamases à spectre étendu sont retrouvées principalement chez *Escherichia coli* et *Klebsiella*, ainsi que *Enterobacter*, plus rarement *Serratia*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Salmonella*, *Shigella* ou des bactéries Gram négatif non fermentatives comme *Pseudomonas*, *Acinetobacter* et d'autres (Vora et Auckenthaler, 2009).

En effet, une BLSE est une bêta-lactamase le plus souvent d'origine plasmidique donc transmissible à d'autres bactéries, hydrolysant les pénicillines, céphalosporines et aztréonam, mais pas les céphamycines (céfoxitine) ni les carbapénèmes. Leur activité est inhibée in vitro habituellement par les inhibiteurs de bêta-lactamases (Vora et Auckenthaler, 2009).

La présence de ce type de mécanisme de résistance au sein de souches pathogènes fait peser un risque majeur d'inadéquation thérapeutique et donc d'échec thérapeutique et est également un facteur de diffusion (Vora et Auckenthaler, 2009).

Les bêta-lactamases sont diverses enzymes hydrolysant le pont amide du cycle bêtalactame pour donner un acyl-enzyme qui sera ensuite dégradé en acide inactif (Figure 07).

5-2 Classification des bêta-lactamases à spectre étendu

Les bêta-lactamases ont été classées selon leur structure par Ambler et par leur fonction par Bush Jacobi.

5-2-1 Classification d'Ambler

La classification moléculaire d'Ambler (**Ambler, 1980**), a été proposée en 1980 elle est basée sur des critères phylogénétiques. Ainsi, ont été décrites une classe de sérine-enzymes (classe A) et une classe de métallo-enzymes (Classe B). Alors que la classe C de céphalosporinases (sérine-enzymes) et la classe D, regroupant les « oxacillinases » ont été identifiées plus tard et sont dissociées des autres classes de sérine-enzymes. Cette classification, tient compte des analogies de séquences peptidiques, particulièrement celles du site enzymatique.

5-2-2- Classification de Bush-Jacobi-Medeiros

La classification de Bush-Jacobi-Medeiros (**Bush Jacoby et Medeiros, 1995**), est plus fonctionnelle et reflète mieux le spectre exact des enzymes, prenant en compte le profil de substrat ainsi que le profil d'inhibition. Elle reste, malgré tout, peu utilisée en pratique médicale (**Kildie et Julie, 2006**).

- ❖ **Groupe1** : comprend les B-lactamases chromosomique de classe C, les bactéries produisant de telles B-lactamases sont résistantes aux aminopénicillines, aux inhibiteurs de B-lactamases (acide clavulanique) et aux C1G.
- ❖ **Groupe2** : est de loin le plus vaste et comporte des B-lactamases le plus souvent inhibée par l'acide clavulanique. il est composé de pénicillinase, céphalosporinase, oxacillinase et carbapénèmase (chromosomique ou plasmidique),
- ❖ **Groupe 3** : correspond à des métallo-enzymes conférant la résistance à la quasi-totalité desβ-lactamines excepté les monobactames en général retrouvé chez les Pseudomonas, peu ou pas inhibé par l'acide clavulanique.

- ❖ **Groupe 4** : contient des enzymes divers non entièrement séquencées et non inhibées par l'acide clavulanique (Jacob. G., 2011).

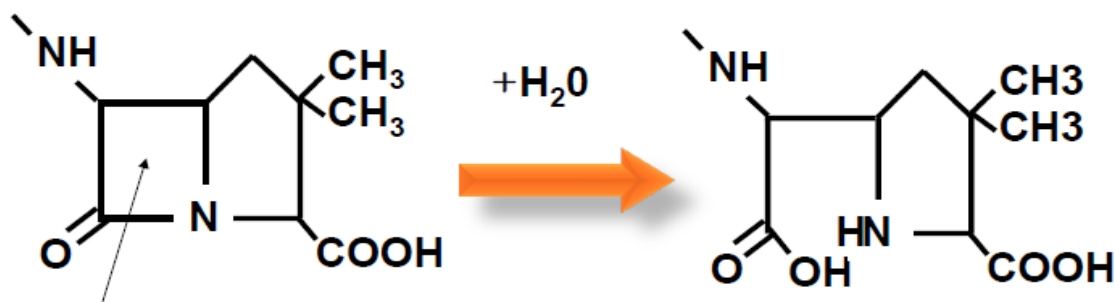


Figure 07 : Schéma réactionnel de l'ouverture du cycle bêta-lactame par les bêta-lactamases.

5-2-3- Différents types de BLSE

A. BLSE de type TEM (TEMONEIRA –NOM DU PATIENT) :

De nombreux dérivés de TEM-1/2 (> 150) ont été décrits à ce jour, dont plus de 100 avec un phénotype de BLSE (Bradford, 2001 ; Paterson et Bonomo, 2005). Bien que fréquemment trouvée chez *E.coli* et *K. pneumoniae* (George et al., 2005).

En Europe, les BLSE de type TEM les plus fréquentes sont TEM-24 (*Enterobacter aerogenes*), TEM-3 et TEM-4 (*K.pneumoniae*), TEM-52 (*Salmonella entérique* et *E.coli*) (Cantón et al., 2008), et plus courantes en Amérique du Nord sont les TEM-10, TEM-12 et TEM-26 (Paterson et al., 2003).

B. BLSE de type SHV (SULFHYDRYL-VARIABLE) :

Les SHV ont une structure similaire à 68% avec le TEM (Kuzin et al., 1999). SHV-5 et SHV-12 prédominent actuellement dans les enquêtes des isolats cliniques en Europe et en Amérique le plus souvent chez *K. pneumoniae* (Yuan et al., 1998) mais aussi chez d'autres comme *P.aeruginosa* et *Acinetobacter*

On compte actuellement plus de 160 dérivés de TEM et plus de 110 dérivés de SHV.

C. BLSE de type CTX-M (CEFOTAXIMASE-MUNICH) :

Ces enzymes «émérgentes» pourraient représenter très prochainement les BLSE les plus fréquentes au sein des entérobactéries au niveau mondial après une diffusion rapide depuis le milieu des années 90 (Bonnet et al., 2004 ; Livermore et al, 2007) Ils ont principalement été trouvés dans des souches de *Salmonella entérique* et *E.coli* (Woodford et al., 2006)

Elle hydrolyse préférentiellement le céfotaxime d'où il présente une résistance à ces antibiotique, tandis que la sensibilité vis-à-vis l'aztreonam est variable.

A ce jour, de nombreux variants de CTX-M ont été décrits (≥ 80) et sont classés en 6 groupes phylogénétiques distinctes : CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-25 (**Rossolini et al., 2008**).

D. BLSE de type OXA (OXACILLINASE)

Elles appartiennent aux Béta-lactamases de la classe D et hydrolysent les isoxazolympénicillines comme la cloxacilline et l'oxacilline.

Elles prédominent chez *Pseudomonas aeruginosa*, mais sont détectées chez d'autres bactéries à Gram-négatif. Chez *E. coli* le type OXA-1 est le plus fréquent et souvent associé au *bla CTX-M-15* chez les souches cliniques (**Karisik et al., 2006 ; Abassi et al., 2008**).

La majorité des Béta-lactamases de type OXA n'hydrolyse pas les céphalosporines à large spectre. Leurs actions sont différentes à celle des BLSE, mais actuellement il y a 11 BLSE du groupe OXA dérivées de OXA-1, OXA-2 et OXA-10.

5.3. Epidémiologie des entérobactéries productrices de BLSE

Au cours des dernières années, on a observé une circulation des souches entre les milieux hospitalier et communautaire.

Il est clairement établi que le développement et la propagation de BLSE sont liés à l'utilisation des bêta-lactamines, que la colonisation du tube digestif joue un rôle important (**Vora et Auckenthaler, 2009**).

Les souches productrices de BLSE étaient souvent associées à des épidémies nosocomiales, notamment en unités de soins intensifs. La prévalence des BLSE était plus forte chez *K. pneumoniae* que chez *E. coli* (**Jacoby et Munoz-Price, 2005**).

En Algérie plusieurs études ont rapporté le groupe CTX-M-1 (CTX-M15 , CTX-M28 et CTX-M3) à l'est Algérien (**Belbel et al., 2014, Nedjai et al., 2012 ; Meradi et al., 2011 ; Touati et al., 2008**) , le centre de l'Algérie (**Labdene et al., 2008 ; Kermas et al., 2012**) et l'ouest Algérien (**Baba Ahmed-Kazi et al., 2013**), ce dernier est le seul groupe identifié en Algérie, cependant CTX-M-15 a été mondialement distribué (**Falagas & Karageorgopoulos, 2009**). Plusieurs facteurs ont pu concourir à ce Switch épidémiologique.

Annexe I

Appareillage et verrerie :

- Liquide désinfectant
- Fiche de renseignements
- Seringues en plastique
- Gants jetables
- La gaze, Ciseaux
- Conteneur pour élimination des déchets
- Etiquettes, Marqueurs, Registres
- Règles graduée ou pied à coulisse
- Nagent
- Boite de pétri
- Ecouvillons stériles
- Anse de platine
- Pincés métalliques
- Bec bunsen
- Lames et lamelles
- Pipettes pasteurs stériles
- Microscope optique
- Agitateur
- Barreau magnétique
- Etuve à 45 °C
- Réfrigérateur à 4°C
- Densitomètre.
- Etuve à 37°C
- Entonnoir
- Bicher
- Ballon
- Papier filtre
- Spatule
- Rotavapeur

- Centrifuge
- Ultrason
- Parafilm
- Papier aluminium
- Balance.
- Disques vaigre de 9mm.
- Bain-marie.

1) Réactifs, solutions et solvants :


- Eau physiologique stérile à 0.9%
- Eau distillée stérile
- Eau oxygénée
- Alcool à 95%
- Huile à immersion
- Antiseptique
- Réactifs de GRIESS NR1 et NR2.
- Méthanol degré HPLC
- Méthanol
- Ethanol
- DMSO
- violet de gentiane
- Lugol.
- La fuschine
- Acide formique
- Matrice HCCA

2) Milieux de culture, milieux d'identification:


- Gélose nutritive.
- Gélose Hektoen.
- Gélose Muller-Hinton.
- Gélose au sang frais
- Gélose au sang cuit
- Citrate de simmons
- TSI

Composition des quelques milieux de culture utilisés en g/l d'eau distillée.


◦ Gélose Nutritive (GN):

Composition	Figure
-peptone5g -extrait de viande 3g -gélatine.....13g pH=6.8 (Delarras, 2007)	

Gélose Muller-Hinton (MH) :

Composition	Figure
-infusion de viande de bœuf300g -hydrolysate de caséine.....17.5g -amidon.....1.5g -gélose..... 10g pH= 7.4 (Poly, 2007)	

Gélose Hektoen

Composition	Figure
-protéose-peptone:.....12,0 g -extrait de levure : facteur de croissance.....3,0g -lactose : critère de différenciation...12,0g -saccharose critere de différenciation.....12,0g -salicine : critere de différenciation.....2,0 g -citrate defer III et d'ammonium revelateur d'H ₂ S.....1,5 g -sels biliaries : inhibiteur.....9,0 g -fuchsine_acide : inhibiteur.....0,1 g -bleu_de_bromothymol indicateur de pH.....0,065 g -chlorure_de_sodium : maintien de la pression osmotique.....5,0 g -thiosulfate de sodium : précurseur d'H ₂ S.....5,0 g -agar.....14,0 g -pH =. 7,6	

Annexe III

Tableau VIII : Rendement des extraits

	Extrait	Rendement en %
Peau	Méthanolique	58
	Ethanolique	59
	Aqueux	43

Tableau IX : La gamme d'étalonnage de l'acide gallique

Concentration en $\mu\text{g/ml}$	1000	500	250	125	62,5	31,25	15,62	7,81	3,9	1,95
Absorbance à 765 nm	3,135	2,101	1,067	0,656	0,33	0,228	0,158	0,131	0,114	0,112



























Tableau X : Teneur des polyphénols totaux en mg EAG/100g de grenade

	Extrait	Teneur en polyphénols (mg EAG/100g de grenade)
Peau	Méthanolique	76,625
	Ethanolique	79,59
	Aqueux	275,062

Tableau XI : Les souches concernées par les tests et leurs sources

Souche	Source
<i>Escherichia coli</i> 1	
<i>Escherichia coli</i> 2	
<i>Escherichia coli</i> 3	
<i>Escherichia coli</i> 4	
<i>Escherichia coli</i> 5	
<i>Escherichia coli</i> 6	
<i>Escherichia coli</i> 7	
<i>Kleibseilla pneumoniae</i> 1	
<i>Kleibseilla pneumoniae</i> 2	
<i>Kleibseilla pneumoniae</i> 3	
<i>Kleibseilla pneumoniae</i> 4	Service laboratoire centrale de l'EHS
<i>Kleibseilla pneumoniae</i> 5	ELHADI FLICI (EL KETTAR) Alger
<i>Kleibseilla pneumoniae</i> 6	
<i>Kleibseilla pneumoniae</i> 7	
<i>Kleibseilla pneumoniae</i> 8	
<i>Kleibseilla oxytocae</i>	
<i>Ecteroacter cloacae</i> 1	
<i>Ecteroacter cloacae</i> 2	
<i>Ecteroacter cloacae</i> 3	
<i>Citrobacter koseri</i>	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	

Tableau XII : Tableau de lecture de la galerie API 20^E.

TABLEAU DE LECTURE DE LA GALERIE MINIATURISÉE API 20E						
Microtube	Substrat :	Caractère recherché	Révéléateur	Lecture directe ou indirecte Test (si nécessaire)	Résultat -	Résultat +
ONPG	ONPG = Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside	Béta galactosidase		Lecture directe		
ADH LDC ODC	Arginine Lysine Ornithine	Arginine Dihydrolase Lysine Décarboxylase Ornithine Décarboxylase	Rouge de phénol	Lecture directe		
[CIT]	Citrate	Utilisation du citrate	BBT	Lecture directe		
H ₂ S	Thiosulfate de sodium	Production d'H ₂ S	Fe III	Lecture directe		
URÉ	Urée	Uréase	Rouge de Phénol	Lecture directe		 
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase		Lecture indirecte		
IND	Tryptophane	Tryptophanase ou production d'indole		Lecture indirecte	 	 
[VP]	Pyruvate de sodium	production d'acétoine (3-hydroxybutanone)		Lecture indirecte		 
[GEL]	Gélatine	gélatinase	Particules de charbon	Lecture directe		
GLU à ARA = zymogramme	Substrat carboné (glucide)	Utilisation de substrats carbonés (glucides)	BBT	Lecture directe		
NO ₂ -/N ₂	Nitrates (NO ₃ -)	Nitrate réductase		Lecture indirecte		

Lecture des résultats de la galerie :

Résultats reportés sur la fiche d'identification

Ident.

Se référer au catalogue pour identifier la souche à l'aide du code

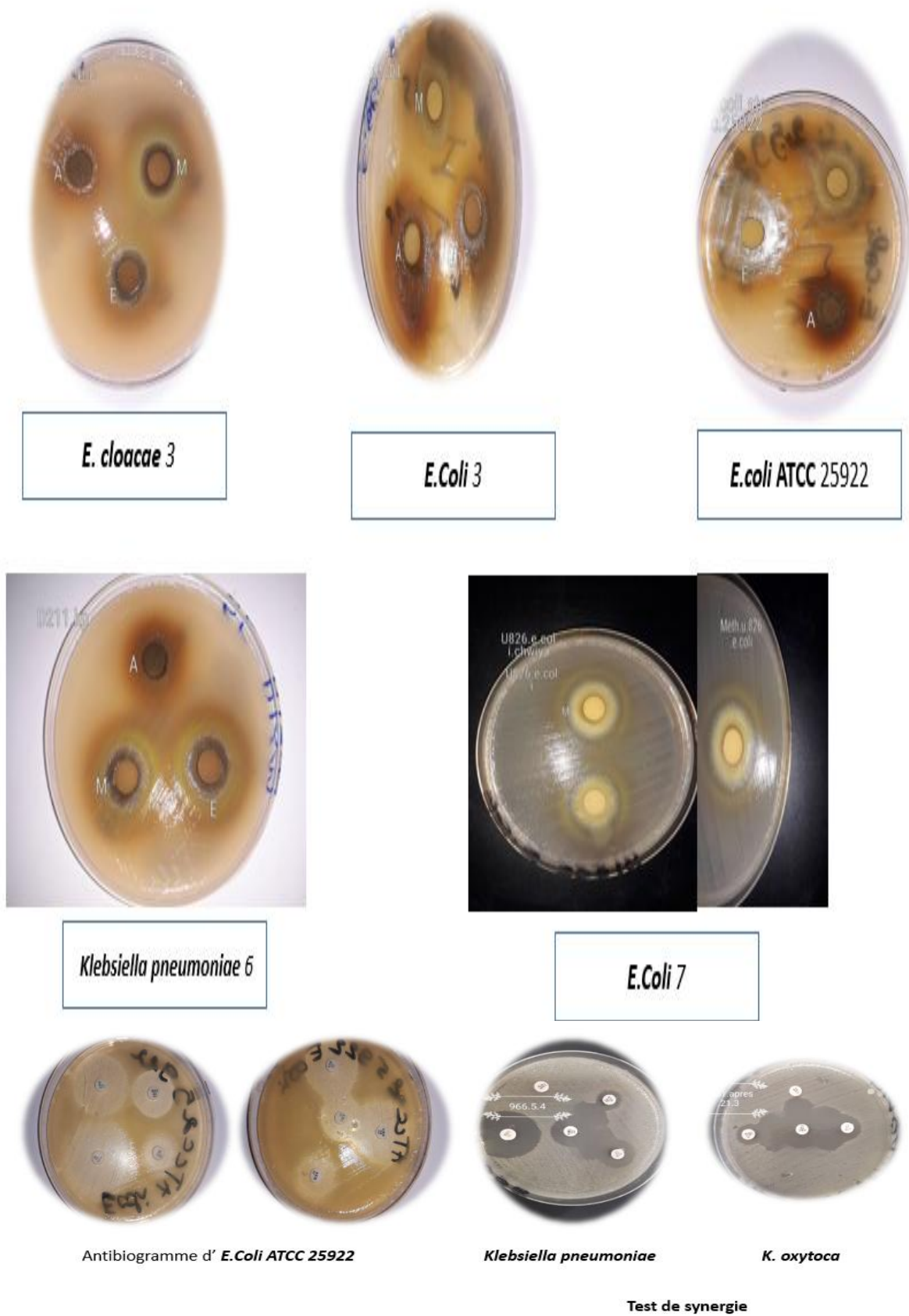


Figure 36 : Quelques zones d'inhibition de quelques souches (Aromatogramme)

المؤسسة الإستشفائية المتخصصة في الأمراض المعدية - الهادي فليسي - الجزائر
 ETABLISSEMENT HOSPITALIER SPECIALISE EN MALADIES INFECTIEUSES
EL - HADI FLICI - ALGER
 LABORATOIRE CENTRAL DE BIOLOGIE

FICHE DE RENSEIGNEMENTS CLINIQUES

N° d'ordre : _____ N° du dossier : _____ Service : _____
 Nom : _____ Prénom : _____ Age : _____ Sexe : _____
 Medecin traitant : _____ Profession : _____
 Adresse : _____ Commune : _____ Wilaya : _____

EXAMEN BACTERIOLOGIQUE

* Hémo-culture :
 * Examen Cytobactériologique :

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
LCR	Urines	Pus	Autres Préciser : _____

* Coproculture :
 * Recherche de BK

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
TG/EX	LCR	LP	Autres Préciser : _____

Tout prélèvement de bactériologie doit être adressé le jour même au laboratoire avant 10 H.
 Date des précédents prélèvements de même nature : _____
 Résumé Clinique : _____

 Diagnostic présomptif : _____
 Antibiothérapie en cours : _____ Date du début : _____ Nature : _____

 Antibiothérapie antérieure : _____ Durée : _____ Nature : _____

 Date et heure du prélèvement : _____

SIGNATURE DU MEDECIN.

Figure 37 : Fiche des renseignements

Annexe II

Techniques de prélèvement

a) Prélèvement d'urine

Le prélèvement s'effectue après nettoyage du méat urinaire avec une solution antiseptique en recueillant les premières urines du matin en milieu du jet, selon la technique dite « du milieu de jet ».

Les urines sont recueillies dans un tube stérile (environ 10 à 20 ml), le tube est fermé hermétiquement et porté au laboratoire dans une demi-heure, sinon il faut le placer dans de la glace (Djennane *et al.*, 2009).

Chez le nourrisson, après une désinfection soigneuse de la région périnéale et afin d'éviter toute contamination fécale, un sac collecteur stérile spécifique, muni d'un adhésif est fixé à vulve chez la petite fille ou à la verge chez le petit garçon pendant une heure, ce dernier est acheminé dans les plus brefs délais au laboratoire.

b) Prélèvements de LCR (Liquide Céphalo-Rachidien)

L'examen cytbactériologique du LCR permet de faire le diagnostic des méningites purulentes grâce à l'étude du LCR obtenu par ponction lombaire obligatoirement par le médecin traitant.

c) Prélèvements de pus

Le pus peut avoir diverses origines :

- Dans le cas où le pus est localisé dans un abcès superficiel fermé ou dans une cavité séreuse, le pus est récolté par ponction à l'aide d'une seringue stérile et cela après une désinfection soigneuse de la peau.
- Dans le cas des abcès ouverts, plaies suppurées ou pustules et les fistules où le pus s'écoule à l'extérieur, le prélèvement alors se fait à l'aide d'un écouvillon après désinfection de la plaie. Le prélèvement est effectué dans la partie la plus profonde de la plaie tout en évitant la contamination par la flore cutanée saprophyte. L'écouvillon

doit être acheminé au laboratoire et humidifié par un bouillon afin d'éviter la dessiccation de prélèvement (**Ploy et Denis, 2007**).

La galerie biochimique classique

4.2.1.1 Test d'oxydase

Test de détection de l'enzyme « Phénylène diamine oxydase », chez les bactéries à Gram négatif, qui oxyde la forme réduite des dérivés de méthyle en donnant une couleur violette afin de différencier les Entérobactéries des *Pseudomonas*.

➤ **Technique :**

Etaler sur le disque d'oxydase imprégné une colonie bactérienne. Un test positif se traduit par une coloration violet pourpre en 10 secondes (**Larpent et Larpent-Gourgaud, 1997**).

➤ **Lecture**

- Coloration violette foncée puis noire : Oxydase (+) *Pseudomonas*
- Absence de coloration : Oxydase (-) Entérobactéries.

4.2.1.2 Test d'ONPG (Ortho-Nitro-Phenyl-β.D.Galactosidase)

Ce test est réalisé pour étudier l'existence d'une Bêta-Galactosidase chez le germe, donc la possibilité de la fermentation effective du lactose indépendamment de la perméase bactérienne.

Pour déceler cette Bêta-galactosidase, on va mettre la bactérie en présence d'un réactif analogue au Lactose Ortho-Nitro-Phenyl-β.D.Galactosidase (ONPG) qui donne le Lactose et L'Orthonophényl présentant une coloration jaune.

➤ **Technique :**

Le test est pratiqué en réalisant une suspension dense de la bactérie testée dans de l'eau distillée puis à l'aide d'une pince flambée et refroidie nous avons ajouté un disque imprégné d'ONPG et nous avons mis le tube dans l'étuve pendant 15 à 20 minutes. La présence d'une bêta-galactosidase se traduit par la libération de l'orthophényle soluble de couleur jaune qui apparaît après la durée d'incubation (**Delarras, 2007**)

Lecture : -Couleur jaune : ONPG (+). -Pas de coloration : ONPG (-).

4.2.1.3 Milieux d'identification

➤ **T.S.I (Tree-Sugar-Iron)**

Milieu permettant la mise en évidence le dégagement ou non du gaz, la production de l'H₂S et la fermentation des trois sucres : Glucose (culot), Lactose et Saccharose (pente).

➤ **Technique :**

D'abord ensemercer la pente par des stries serrées avec une pipette Pasteur après avoir prélevé la colonie à tester, puis le culot par une piqure centrale, la lecture se fait après 24h d'incubation à 37°C.

➤ **Lecture :**

- Virage de couleur de la pente vers le jaune : fermentation de lactose et saccharose.
- Virage de couleur du culot vers le jaune : fermentation de glucose.
- Noircissement du milieu : production de H₂S.
- Formation de bulles de gaz dans la masse du culot : production de gaz.

➤ **Citrate de Simmons**

Le milieu utilisé pour le test fermentation du citrate contient également des sels minéraux d'ammonium. En effet, un organisme capable d'utiliser le citrate métabolise également les sels d'ammonium comme seule source d'azote. L'alcalinisation du milieu provient de la libération de NH₃ à partir des sels (**Larpent et Larpent Gourgaud, 1997**).

- **Technique :** La moitié du milieu sera ensemencée par des stries serrées ascendantes avec une goutte de la suspension bactérienne, l'autre moitié servira comme témoin, puis incubé à 37°C pour 24h.

- **Lecture**
 - Virage de couleur de vert au bleu : Citrate positive.
 - Le milieu reste vert : Citrate négative.
- **Urée-indole**

Le milieu Urée-tryptophane, improprement dit Urée-indole, permet de réaliser 3 tests :

 - Test Uréase : démontrer la dégradation de l'urée en ammoniac par l'Uréase.
 - Test d'Indole : certaines bactéries dégradent le tryptophane en indole grâce à une Tryptophanase.
 - Test TDA : le « Tryptophane désaminase » agit sur le tryptophane en donnant l'acide indole pyruvique.
- **Technique :**

Additionner quelques gouttes de la suspension bactérienne à étudiée dans le milieu puis incubé à 37°C pour 24h. Le lendemain, diviser le contenu du tube en deux :

 - L'un servira à la recherche de l'indole par l'ajout de quelques gouttes du « KOVACS ».
 - L'autre servira à la recherche de T.D.A par adjonction du réactif T.D.A.
- **Lecture**
 - Changement de coloration de jaune au rose : Uréase (+).
 - Absence de virage de couleur : Uréase (-).
 - Formation d'un anneau rouge après l'addition de Kovacs : Indole (+).
 - Virage de couleur au rouge-brun après ajout du TDA : TDA(+).



Figure 38 : la galerie classique utilisée au cours de diagnostic

➤ Coloration différentielle de Gram

La première étape d'identification consiste à réaliser ; une coloration de Gram.

➤ *Principe*

C'est la coloration de référence en bactériologie mise au point en 1884 par Hans Christian Gram et permettant la distinction entre les bactéries à Gram+, colorées en violet, ayant une paroi riche en peptidoglycane donc imperméable à l'alcool, et les bactéries à Gram-, colorées en rose, avec une paroi riche en lipides donc perméable à l'alcool qui décolore son cytoplasme, ainsi cette coloration permet de déterminer le mode d'arrangement.

En effet lorsque les bactéries sont mises au contact du violet de gentiane et ensuite soumises à l'action du lugol, il se forme un complexe colorant qui colore en violet tout le cytoplasme des bactéries. Cependant lorsque ces bactéries colorées sont lavées à l'alcool, seule la paroi des bactéries à Gram négatif, du fait de sa structure particulière (glucido-lipido-protéique) se laisse traversée par l'alcool et entraîne ainsi la décoloration de celles-ci qui seront ultérieurement colorées par la Fuschine. Ces dernières seront appelées bactéries à Gram négatif (Avril, 1997).

➤ *Technique*

- ❖ Préparation d'un frottis : à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, on prélève une colonie bien isolée pour faire un étalement mince sur une lame porte- objet.
- ❖ Fixation du frottis : en passant la lame sur la flamme (le coté étalé avec l'échantillon est dirigé vers le haut) puis laisser refroidir.
- ❖ Puis il est entièrement recouvert de violet de gentiane pendant 1 min On rince ensuite à l'eau de robinet.
- ❖ Le frottis est ensuite recouvert de lugol pendant 1 min, Puis on décolore à l'alcool (la décoloration est arrêtée au moment où l'alcool n'entraîne plus de colorant) On lave rapidement à l'eau en vue d'arrêter l'action de l'alcool.
- ❖ Le frottis est enfin recouvert de fuch sine pendant 20 s, puis lavé à l'eau et séché.

Ensuite le frottis est examiné au microscope optique avec une goutte d'huile à immersion, à grossissement x100.

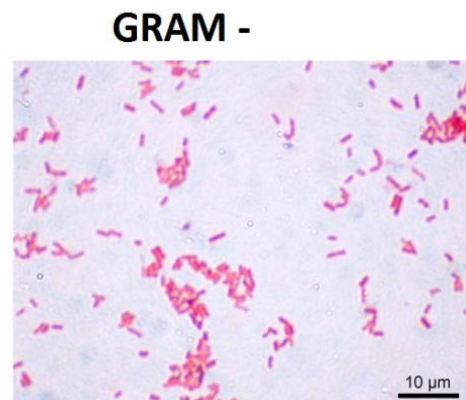
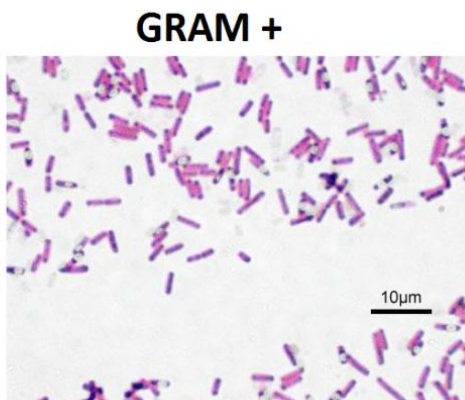


Figure 39 : les réactifs de coloration de Gram

➤ *La lecture*

Les bactéries à Gram positifs sont colorées en violet foncé et celle à Gram négatifs en rose.

Les entérobactéries se présentent comme des bacilles Gram- de taille moyenne



1- 7- 2- Propriétés antioxydantes

Les éllagitannins sont responsable à 92% de l'activité antioxydante du grenade et sont concentrés dans l'écorce, les membranes du fruit (**Seeram et al., 2005**). Les polyphénols de grenade protègent les LDL contre l'oxydation à médiation cellulaire via deux mécanismes qui mettent en jeu une interaction directe des polyphénols avec la lipoprotéine et/ou une action indirecte liée à l'accumulation des polyphénols dans les macrophages artériels. Il a ainsi été démontré que les polyphénols de grenade inhibent l'oxydation des LDL en détruisant les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote.

1- 7-3- Propriété anticancéreuse

Nombreuses études ont été réalisées pour évaluer l'efficacité de *Punica granatum*L. contre différents types de cancer (**Lansky et Newman.2007 ; Hong et al., 2008**).

Hong et al. (2008) ont démontré que le jus de grenade constitue un puissant inhibiteur de la croissance cellulaire, et il est même plus puissant que certains polyphénols. Ils suggèrent ainsi un effet synergique des composés phytochimiques présents dans le grenadier et dans ses extraits.

Seeram et al. (2005) ont décrit l'activité antiproliférative des extraits de grenade sur diverses lignes cellulaires tumorales, avec une grande inhibition de l'ordre de 30% jusqu'à 100% dû à la présence de l'acide éllagique et la punicalagine.

1- 7-4- Propriété antidiabétique

Depuis des centaines d'années, les fleurs de *Punica granatum*L. ont été utilisées dans le traitement du diabète sucré à travers quelques pays du monde (**Saxena et Vikram, 2004**).

Dans notre pays et principalement dans la région de Tlemcen, *Punica granatum*L. (Épicarpe) est parmi les plantes utilisées traditionnellement dans le traitement du diabète sucré d'après les informations ethnobotaniques recueillies par **Khalil (2004)**, qui a montré que l'extrait aqueux de l'épicarpe de *Punica granatum*L. Provoque une diminution de la glycémie chez les rats normaux et rendus diabétiques par l'alloxane.

La consommation de grenadier par les patients diabétiques de type 2 ayant une hyperlipidémie provoque une diminution du taux de cholestérol total. Cette activité a été démontrée par les travaux d'**Esmailzadeh et al., (2006)**.

2 - les entérobactéries

2-1 Définition

La famille des *Enterobacteriaceae* est hétérogène car elle se compose actuellement plus de 53 genres et 210 espèces bactériennes (Cohen, et al., 2017), tous ces germes ont en commun plusieurs caractères :

Apparentés en bacille à Gram négatif ; immobiles ou mobiles grâce à leur ciliature péritriche, se développant aisément sur milieux ordinaires, aérobies facultatifs, faisant fermenter le glucose avec ou sans production de gaz, ne possédant pas d'oxydase, réduisant les nitrates en nitrites (quelques exceptions parmi *Erwinia*) (Veron, 1990).

2-2- Classification

Cette grande famille est classée selon **Bergey's Manuel, 2004** comme suit (**bergey's manual, 2004**) :

- **Embranchement** : Gracilicutes Gram-
- **Domaine** : *Eubacteria*
- **Phylum XII** : *Proteobacteria*
- **Classe** : *Gammaproteobacteria*
- **Ordre** : *Enterobacteriales*
- **Famille** : *Enterobacteriaceae*
- 53 genres dont les genres récents *Alterococcus*, *Arsenophorus*, *Brenneria*, *Pectobacterium*, *Raoultella*, *Samsonia*, *Sodalis*.

Les entérobactéries qui intéressent la bactériologie médicale peuvent être regroupées en 4 tribus : *Escherichia*, *Klebsiellae*, *Proteae* et *Yersinia* (Denis, 2007).

2-3 Habitat et rôle écologique

Le nom d'entérobactérie fait référence à la localisation préférentielle de cette famille de microorganismes dans le tube digestif principalement le côlon de l'homme et des animaux (Scheftel, 2010), certains faisant d'ailleurs partie des hôtes normaux de l'intestin et représentent la majorité de la microflore intestinale aéro-anaérobie (Ndiaye, 2005). Mais ce caractère écologique n'est pas exclusif des entérobactéries puisqu'ils peuvent proliférer en abondance dans l'environnement (sols et eaux), d'autres chez les végétaux où ils participent aux grands cycles de dégradation des matières organiques (Drame, 2001).

2-4- Caractères bactériologiques

2-4-1 Morphologie

Toutes les entérobactéries se présentent comme des bacilles de taille moyenne, Gram négatif, varient entre 0.5 et 1 μm de large et entre 1 et 6 μm de long (**Brossard et Leyral, 2006**) Les espèces mobiles les plus nombreuses le sont grâce à une ciliature péritriche et Certaines sont immobiles (*Klebsiella*, *Shigella*, *Yersinia pestis*).

2-4-2 Conditions de multiplication

Les entérobactéries poussent facilement sur les milieux ordinaires en 24 heures à 37°C en aérobiose et en anaérobiose, à un pH optimal entre 7,2 et 7,4. Leurs exigences nutritionnelles sont, en général, réduites et la plupart se multiplient en milieu synthétique avec une source de carbone simple comme le glucose (**Bakhoum, 2004**).

2-4-3 Caractères cultureux

Les colonies sont généralement rondes, lisses, à contour régulier et leur diamètre est de 2 à 3 mm après 18 heures d'incubation à 35-37 °C. En bouillon, on obtient un trouble homogène. Quelques espèces font cependant exception. Ainsi, les colonies de *Shigella* spp. Sont plus petites que celles d'*Escherichia coli* et les colonies de *Yersinia* spp. N'atteignent un diamètre de 2 mm qu'après 2 à 3 jours d'incubation (**Euzéby, 2009**).

Des colonies muqueuses, de consistance gélatineuse, de taille plus importante, présentant une tendance à la confluence, sont fréquemment obtenues avec les souches capsulées du genre *Klebsiella*. Un aspect similaire peut également être rencontré avec des souches d'*Escherichia coli* et exceptionnellement avec des souches du genre *Salmonella* (**Euzéby, 2009**) (**Tableau XIII**).

Tableau XIII : Aspect macroscopique et orientation d'identification des genres de la famille des *Enterobacteriaceae* (Delarras, 2007).

Milieu selectif	Couleur des colonies	Fermentation des sucres	Genre et espèce
EMB	colonies de diametre 2 à 3mm, éclat métallique verdâtre par refraction, couleur sombre à noire.	Lac +	<i>Escherichia coli</i>
	colonies de diametre 4 à 6mm, centre gris à marron, pas d'éclat métallique	Lac +	<i>Enterobacter</i>
	Colonies grisâtres	Lac -	<i>Salmonella</i> et <i>Shigella</i>
SS	Rose à rouge	Lac +	<i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Klebsiella</i> ,
	Incolore, transparente	Lac -	<i>Salmonella paratyphi</i> , <i>Shigella</i>
	Incolore, à centre noir	Lac-, H ₂ S+	Les autres <i>Salmonelles</i> , <i>Proteusvulgaris</i> , <i>Proteus mirabilis</i>
Hectoen	Jaune à jaune-saumon	au moins un sucre fermenté	<i>E.coli</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i> .
	Jaune à jaune-saumon centre noir	au moins un sucre fermenté, H ₂ S +	<i>Proteusvulgaris</i>
	Vert à bleu-vert centre noir	Lac- , H ₂ S+	<i>Proteus mirabilis</i> <i>Salmonella</i>
	Vert - centre noir	Lac -, H ₂ S+	<i>Salmonella typhimurium</i>

2-4-4- Caractères antigéniques

Outre l'antigène de Kunin, les entérobactéries présentent ;

- un antigène de paroi de nature lipopolysaccharidique (ou antigène O) ;
- un antigène flagellaire de nature protéique (ou antigène H)
- un antigène de nature polysaccharidique (ou antigène K) correspondant soit à d'authentiques antigènes capsulaires soit à des structures non visibles au microscope optique (**Euzéby, 2009**)

2-5- Etude des principaux genres

2-5-1- *Escherichia*

C'est un bacille Gram négatif, anaérobie facultatif possédant une ciliature péritriche et des flagelles (**Philipon, 2004**) isolé pour la 1^{ère} fois par Escherich en 1885, cette bactérie est connue depuis longtemps comme commensale du tube digestif de l'homme et l'animal.

E. coli possède tous les caractères décrits plus haut comme étant communs aux *Entérobacteriaceae* mais il est en outre (**Gueye, 2007**) :

Lactose +, indole +, citrate –, acétoïne – (VP), H₂S- (souvent), gaz +, uréase–.

➤ *Facteurs de virulence*

Les principaux facteurs de pathogénicité d'*E.coli* sont les adhésines, la capsule, le lipopolysaccharide (LPS), les systèmes de captation du fer et les toxines.

Les antigènes polysaccharidiques K de la capsule sont capables de s'opposer à la phagocytose et le LPS et les protéines de la membrane externe sont en mesure d'empêcher la fixation des molécules du complément et donnent ainsi aux bactéries la capacité d'échapper à l'activité bactéricide du sérum de l'hôte.

Les toxines telles que l'endotoxine, les entérotoxines ST (thermostables) et LT (thermolabiles) et les cytotoxines SLT1 et SLT2 constituent aussi un facteur de virulence important dans la pathogénicité des souches d'*E.coli* responsables de syndrome diarrhéiques (**Mainil, 2003 ; Kern-Benaibout, 2006**).

➤ **Résistance aux antibiotiques**

E. coli se caractérise par son aptitude particulière à acquérir des mécanismes de résistance à des antibiotiques habituellement actifs, pouvant parfois survenir en cours d'antibiothérapie (**Grude et al., 2001**).

Il existe près de 50% des souches d'*E.coli* résistantes à l'amoxicilline par production d'une β -lactamase qui est la plus souvent inhibée par l'acide clavulanique et les autres inhibiteurs. Il existe actuellement des souches productrices de β -lactamases à spectre élargi qui leur confèrent une résistance à toutes les β -lactamines à l'exception des carbapénèmes ; cephamycines et de la témocilline. Ces souches peuvent poser de sérieux problèmes thérapeutiques en milieu hospitalier (**Grude et al., 2001**).

2-5-2- Klebsiella

Les klebsiella sont des bactéries immobiles, en diplobacilles, généralement capsulées (**Berra, 2005**) qui ont un métabolisme fermentaire particulier, isolé de l'homme et des animaux à sang chaud (**Chouder, 2006**). Ce genre de bactérie est commensal du tube digestif et des voies aériennes supérieures (**Sougakoff et Trystram, 2003**)

Il est composé de quatre espèces : *K. oxytoca*, *K. rhinoscleromatic*, *K.ozena* et *K. pneumoniae* qui est le plus fréquemment retrouvé en clinique humaine.

Klebsiella pneumoniae est en général ; Gaz +++, lactose +, ONPG +, urée +, indole -, VP+, ODC-, LDC+ (**Janda et Abbott, 1998 ; Farmer, 1985**).

➤ **Pouvoir pathogène**

Les espèces les plus importantes en bactériologie médicale sont :

- ❖ *K. pneumoniae* est un germe commensal du tube digestif et des voies aériennes supérieures. C'est aussi un germe opportuniste impliqué dans des infections nosocomiales, des infections urinaires, des pneumopathies et des septicémies (**Berra, 2005**).
- ❖ *K. oxytoca*, cette bactérie est dans la majorité des cas isolée dans les selles, mais peut aussi être isolée dans les urines, le sang et les sécrétions naso-pharyngées et trachéales. A l'instar de *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* peut infecter les voies urinaires et respiratoires des patients hospitalisés (**Mirabaud, 2003**).

➤ **Résistance aux antibiotiques**

K. pneumoniae est naturellement résistant aux pénicillines (amoxicilline, ticarcilline) par production d'une bêta-lactamase de classe A d'espèce (chromosomique) appelée K2, inhibée par l'acide clavulanique (**Sougakoff et Trystram, 2003**).

Par, contre elle est habituellement sensible aux C3G, aztréonam, cefpirome, céfépime, céfoxitine, imipénème et associations avec les inhibiteurs de bêta-lactamase ; à tous les aminosides, y compris isépanmycine ; aux fluoroquinolones ; au cotrimoxazole, chloramphénicol, aux cyclines, à la rifampicine (**Sougakoff et Trystram, 2003**).

2-5-3- Enterobacter

Ce sont des entérobactéries VP + (production d'acétoïne) comprenant plusieurs espèces :

Enterobacter cloacae est l'espèce type, *E. aerogenes* (anciennement *Klebsiella mobilis*), *E. agglomerans* (reclassifiée sous le nom *Pantoea agglomerans*), *E. gergoviae*, *E. sakazakii* (aussi *Cronobacter sakazakii*), *E. cowanii*, *E. hormaechei*, *E. taylorae*, *E. asburiae*, *E. intermedius*, *E. amnigenus*, *E. dissolvens*, *E. kobei*, *E. pyrinus*, *E. nimpressuralis* (**Le minor et Veron, 1989**).

➤ **Pouvoir pathogène**







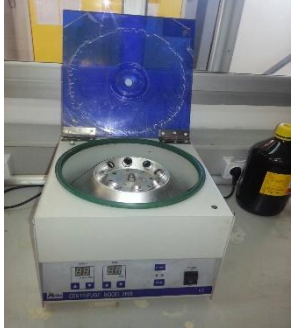
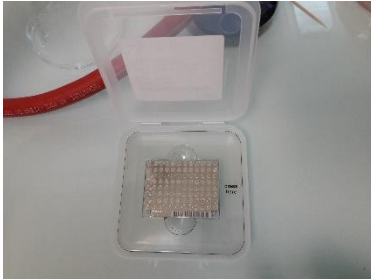

Concernant le pouvoir pathogène, les *E. cloacae* sont des germes qui colonisent souvent les patients hospitalisés et plus particulièrement ceux traités par antibiotiques. Ils ont été associés à des épidémies nosocomiales et sont considérés comme des pathogènes opportunistes (**Hart.2006 ; Pagotto et al. 2003**). Ils peuvent causer de nombreux types d'infections, y compris abcès cérébraux, pneumonie, méningite, septicémie et infection de plaies, infection des voies urinaires et des infections de la cavité abdominale ou des intestins (**Farmer et al. 2007**). De plus, ils ont été observés dans des infections liées à des appareils intravasculaires et des infections au point de chirurgie (surtout des infections postopératoires ou liées à des dispositifs comme des prothèses biliaires).



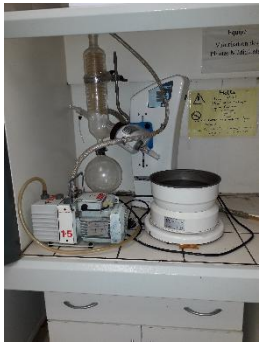
➤ **Résistance aux β -lactamines**







Différents types de β -lactamases ont été décrits chez *E. cloacae*. La céphalosporinase chromosomique est commune pour toutes les souches d'*E.cloacae*. En plus de la céphalosporinase de classe C, d'autres β -lactamases ont été signalés chez cette espèce, y

compris les β -lactamases de type TEM, SHV et CTX-M (**Hoffmann et al., 2006**). Une carbapénèmase spécifique a également été décrite (**Thomson et al., 1993**).

Appareillage et verrerie :

		
<p>HPLC</p>	<p>Lyophilisateur</p>	<p>Bain ultrasonique</p>
		
<p>MALDI-TOF-MS</p>	<p>spectrophotomètre</p>	<p>Chambre chaude</p>
		
<p>Centrifugeuse</p>	<p>La cible de MALDI-TOF-MS</p>	<p>Balance électronique</p>

		
<p>Agitateur</p>	<p>Etuve à 70 °C</p>	<p>Rotavapeur</p>

		
<p>Broyeur électrique</p>	<p>Microscope optique</p>	<p>Agitateur</p>
		
<p>Micropipette</p>	<p>Ballons</p>	<p>Bicher</p>

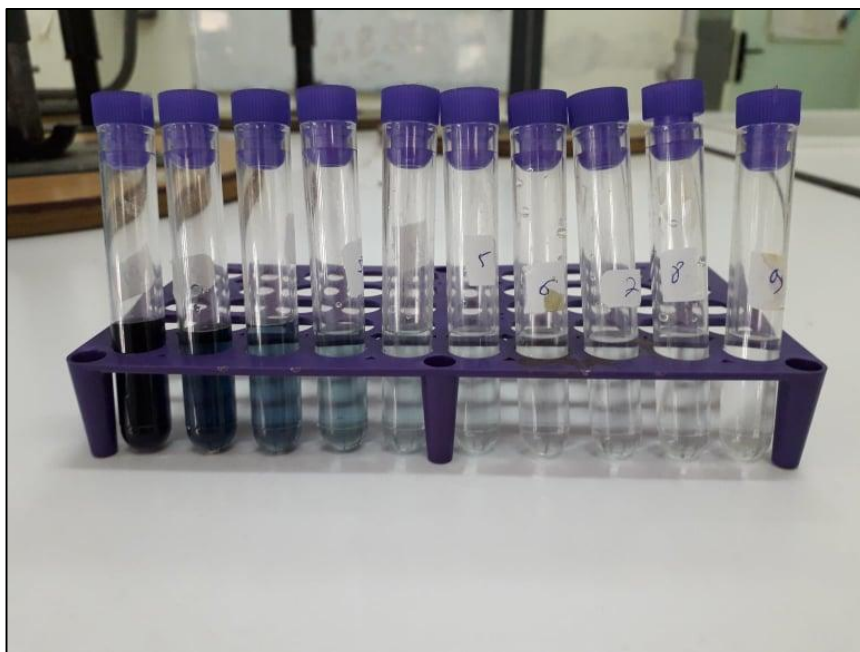


Figure 40 : Résultats du dosage des polyphénols

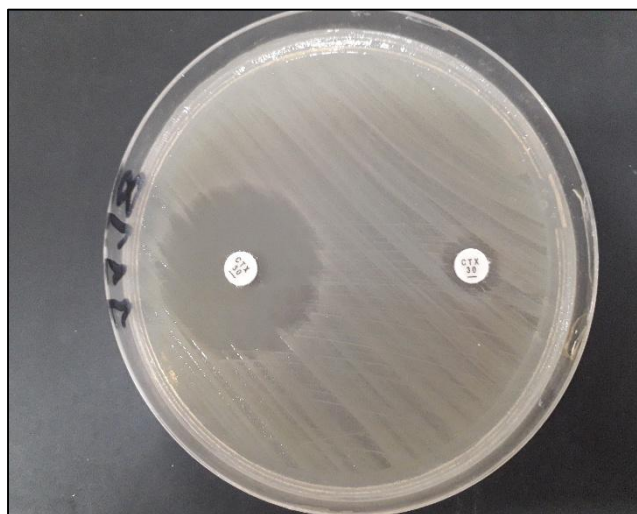


Figure 41 : *Escherichia coli* productrice de BLSE : Test du double disque positif

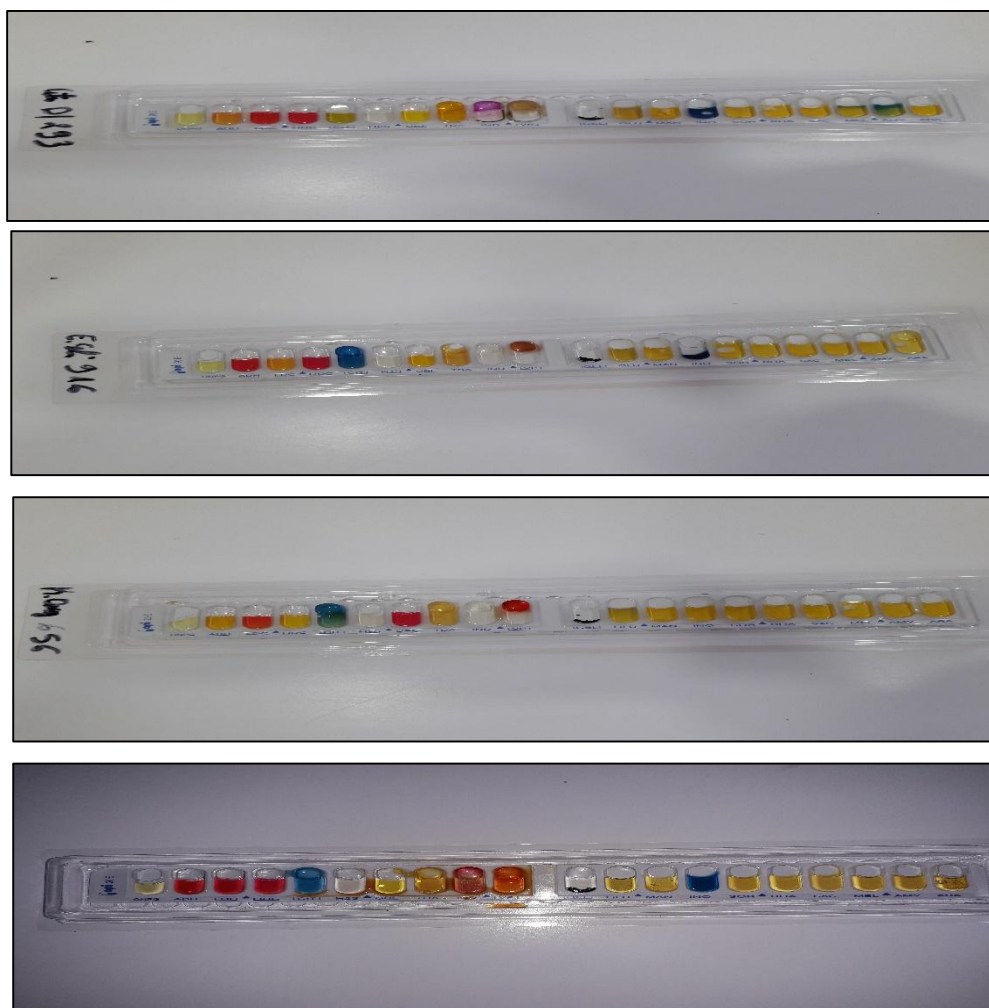


Figure 42 : Exemple de lecture de la microgalérie API 20^E de quelques souches.