

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA

FACULTE DES SCIENCES AGRONOMIQUES, VETERINAIRES ET BIOLOGIQUES

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

*MEMOIRE DE FIN D'ETUDES EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLOME DE MASTER EN SCIENCE DE LA NATURE ET DE LA VIE
Filière :Biologie*

Spécialité :

MICROBIOLOGIE/ BACTERIOLOGIE

THEME

**Extraction et l'étude de l'effet antibactérien des
extraits polyphénoliques de la grenade *Punica
granatum* vis-à-vis des souches *Staphylococcus
aureus* isolées du milieu hospitalier**

Présentée par : M^{elle} MIRAD Meriem

Soutenu le : 19 Septembre 2013 à 9h

Devant le jury composé de :

Mr D. BENDJOURI	M.C.B	USDB	Président
Mr R. MOHAMED SAID	M.A.A	USDB	Examineur
Mme F. HAMAI	M.C.B	USDB	Examinatrice
Mme A. DEBIB	M.A.A	USDB	Promotrice
Mme N. MECHRARA	Médecin	EPH Kolea	Co-promotrice

Promotion: 2012-2013

Remerciements

Avant tout chose, je tiens à remercier Dieu le tout puissant, pour m'avoir donné la force, la patience et la santé pour terminer ce travail.

*J'ai la chance d'effectuer ce travail minutieux dans trois laboratoires : au laboratoire central EPH Koléa, au laboratoire de recherche CRAPC et qu'au laboratoire CPS de Tipaza grâce a Mr **MIRAD R.***

*Tout d'abord, je remercie **Mme DEBIB A** pour le partage de ses connaissances, pour son soutien et pour m'avoir dirigée tout au long de ce travail.*

Mes sincères remerciements aux membres du jury

***Mr D. BENJDOUDI** qui m'a fait l'honneur de présider ce jury.*

***Mr R. MOHAMED SAID** d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

***Mme F. HAMAIDI** d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

*J'exprime mes vifs remerciements à **Mme MACHRARA N** médecin microbiologiste à EPH Koléa pour sa contribution et son aide pour terminer ce mémoire .*

*Je dois remercier aussi le personnel de laboratoire : **Mme KHIREDDINE, Mme BOUDISS, Mlle LALAOU, FAIZA, FOUZIA, SAMIA, LIDIA, SIHEM, FIFI et SALMA** pour leurs conseils.*

Mes vifs remerciements à tous les Enseignants du département de biologie ainsi que tous ceux qui m'ont aidé.

Dédicaces

Je dédie ce travail à :

Ma très chère mère adorable qui ma soutenue pendant toutes mes longues années d'étude.

*Mon très cher père qui m'a permis de continuer mes études dans les meilleures conditions et
qui m'a appris a ne jamais baissé les bras.*

*A la mémoire de mon grand père et mon oncles, que Dieu le puissant les accueillent en son
vaste paradis.*

*Mes très chères sœurs et mon cher et unique frère **Mouhamed Ali.***

Mes grands parents, que dieu me les garde.

Mes chers oncles, tontes, cousins et cousines .

*Toute la famille **MIRAD** et **ABDOUNI.***

*Mes amis et mes amies les biologistes ainsi que tout le groupe de microbiologie
(MICROBIOLOSES 2011).*

*Un spécial remerciement a une personne irremplaçable qui ma soutenu jusqu'au bout, qui a
toujours été présent a mon coté pour m'aider, m'encourager et m'écouter.*

Résumé:

Les infections dues à *Staphylococcus aureus* (MRSA et MSSA) restent des affections graves et leur fréquence a augmenté de façon considérable au cours des dernières années en raison de l'usage extensif des antibiotiques. D'un côté les extraits naturels issus des végétaux contiennent une variété de composés phénoliques auxquelles on attribue un pouvoir inhibiteur des microorganismes. L'objectif de notre étude est d'extraire en première lieu les composés phénoliques présents dans la grenade et évaluer en deuxième lieu *in vitro* l'activité antimicrobienne de ces extraits.

Les résultats obtenues ont montré que les polyphénols de la grenade agissent différemment sur les souches testées où la peau du fruit a une plus grande activité microbienne par rapport aux jus et aux pépins.

Mots clé : *Punica granatum*, polyphénols, *Staphylococcus aureus*, Activité antimicrobienne, résistance.

Abstract:

Infections due to *Staphylococcus aureus* (MRSA and MSSA) remain severe and their frequency has increased significantly in recent years due to the extensive use of antibiotics. On the other hand the natural extracts of plants contain a variety of phenolic compounds, which is attributed to an antimicrobial activity. The aim of our study was to extract in the first place the phenolic compounds present in pomegranate and evaluate secondly *in vitro* antimicrobial activity of these extracts.

The results obtained have shown that pomegranate polyphenols act differently on the tested strains where the skin of the fruit has a higher microbial activity from the juice and seed.

Keywords: *Punica granatum*, polyphenols, *Staphylococcus aureus*, antimicrobial activity, resistance

ملخص:

لا تزال أنواع العدوى الناجمة عن المكورات العنقودية الذهبية (MSSA و MRSA) شديدة الانتشار حيث زادت وتيرتها بشكل ملحوظ في السنوات الأخيرة بسبب الاستخدام الواسع النطاق للمضادات الحيوية. من ناحية أخرى، تحتوي المستخلصات الطبيعية من النباتات على مجموعة متنوعة من المركبات الفينولية، التي تتميز بفاعلية كبيرة ضد الكائنات الحية الدقيقة. تهدف دراستنا إلى استخلاص في المقام الأول المركبات الفينولية الموجودة في الرمان وفي المقام الثاني تقييم أثر هذه المستخلصات على سلالات بكتيرية معزولة من المستشفى . وقد أظهرت النتائج المتحصل عليها نتائج مختلفة من سلالة الى اخرى حيث كانت المركبات الفينولية المستخلصة من قشرة الرمان الأكثر فاعلية بالمقارنة مع المركبات الفينولية المستخلصة من لب و بذور الرمان.

كلمات البحث : الرمان، المركبات الفينولية ، المكورات العنقودية الذهبية، النشاط المضاد للبكتيريا ، ومقاومة

Liste des figures

	Page
Figure 01 : Caractéristiques botaniques du grenadier	6
Figure 02 : Classification des polyphénols	11
Figure 03 : Structure nucléaire des flavonoides	13
Figure 04 : Représentation de grenade	25
Figure 05 : Les composants de grenade utilisée dans le cadre de notre étude	26
Figure 06 : Schéma représente les étapes d'extraction des polyphénols.....	27
Figure 07 : Isolements des souches par la méthode des quadrants.....	28
Figure 08 : aspect macroscopique de <i>S.aureus</i> sur gélose Chapman (a) et sur gélose nutritive (b).	37
Figure 09 : Coloration de Gram de <i>Staphylococcus aureus</i>	38
Figure 10 : Fréquence des souches résistantes aux antibiotiques testés.....	41
Figure 11 : Le rendement d'extraction des extraits phénoliques	42
Figure 12 : Diamètres des zones d'inhibition des 10 souches de <i>S.aureus</i> testées vis-à-vis des extraits du jus	44
Figure 13 : Diamètres des zones d'inhibition des 10 souches de <i>S.aureus</i> testées vis-à-vis des extraits du pépin	45
Figure 14 : Diamètres des zones d'inhibition des 10 souches de <i>S.aureus</i> testées vis-à-vis des extraits de l'écorce	46
Figure 15 : Quelques résultats de l'effet antibactérien des extraits du fruit <i>Punica grunatum</i>	48
Figure A : Test de catalase.....	Annexe 02
Figure B : Test par Mannitol mobilité.....	Annexe 02

Liste des tableaux

Tableau I : Classification de <i>Punica granatum</i>	04
Tableau II : Valeurs nutritionnelles de la grenade pour 100g de portion comestible.....	07
Tableau III : Facteurs de virulence de <i>S.aureus</i> et leur rôle	20
Tableau IV : Les résultats des tests biochimiques de <i>Staphylococcus aureus</i>	38
Tableau V : Résultats de l'antibiogramme de <i>S.aureus</i> a partir de différents prélèvements	39
Tableau VI : Résultats de screening test.....	40
Tableau VII : Liste des antibiotiques (ordre alphabétique des noms).....	Annexe 05
Tableau VIII : Concentrations et diamètres critiques pour <i>Staphylococcus spp</i>	Annexe 05
Tableau IX : Concentrations et diamètres critiques pour <i>Staphylococcus spp</i>	Annexe 05
Tableau X : Concentrations et diamètres critiques pour <i>Staphylococcus spp</i>	Annexe 05
Tableau XI : Rendement des extraits.....	Annexe 06
Tableau XII : Diamètre des zones d'inhibition vis-à-vis les extraits testés (en mm).....	Annexe 06

Liste des abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique.

APGII : Angiosperm Phylogeny Group II.

ATCC: American Type Culture Collection.

ATP: Adénosine TriPhosphate.

DO: Densité optique.

DMSO : DiMethylsulfoxide

EE : Extrait étherique.

Fc: Fragment cristallisable

G : Grossissement. .

HDL : high density lipoprotein (Lipoprotéine de haute densité).

HPLC : High-performance liquid chromatography (Chromatographie en phase liquide à haute performance).

IgG: immunoglobulines de type G.

LDL: low density lipoprotein (Lipoprotéine de basse densité).

MF : Mc Farland.

MRSA : Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (*Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline).

MSSA : methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (*Staphylococcus aureus* sensible à la ménicilline).

N1 : *Staphylococcus aureus* présente dans un prélèvement nasal.

NCBI : National Center for Biotechnology Information (Centre américain pour les informations biotechnologiques).

NR : nitrate réductase.

OMS: Organisation mondiale de la santé

pH : Potentiel hydrogène

PLP : Protéine de liaison aux pénicillines.

Pus 1-5 : *Staphylococcus aureus* présente dans le pus.

PV 2-3 : *Staphylococcus aureus* présente dans un prélèvement vaginale

R : Resistance.

R: Le rendement.

S : Sensible.

TSS : Syndrome de choc toxique

TSST-1: Toxic shock Syndrome Toxin-1

U5 : *Staphylococcus aureus* présente dans un prélèvement urinaire.

INTRODUCTION

CHAPITRE 1

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 2

MATERIEL ET METHODES

CHAPITRE 3

RESULTATS ET DISCUSSION

ANNEXES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

CONCLUSION

Introduction :

La découverte des antibiotiques constituait une véritable révolution dans la lutte contre les maladies infectieuses. Cependant, la consommation inappropriée et l'utilisation abusive d'antibiotiques ont accéléré la sélection de bactéries multirésistantes qui constituent actuellement un réel problème d'antibiothérapie et de santé publique. Les conséquences collectives et individuelles de ce problème sont sérieuses. La plupart des infections, qu'elles soient bénignes ou graves sont de plus en plus difficiles à traiter **(OMS, 2005)**.

Staphylococcus aureus est à la fois un germe commensal et un agent pathogène majeur de l'homme, impliqué dans 1 à 5% des infections communautaires et jusqu'à 30% des infections nosocomiales, qui sont les infections acquise en milieu hospitalier. **(Corne, 2004)**

Staphylococcus aureus est un germe très touché par la résistance aux antibiotiques posant beaucoup de problème sur le plan thérapeutiques.

Au cours des dernières décennies, les recherches scientifiques les plus modernes n'ont fait que confirmer le bien-fondé des vertus thérapeutiques de la plupart des plantes médicinales utilisées de façon empirique depuis des millénaires. Ce savoir traditionnel ancestral transmis de génération en génération est devenu aujourd'hui une mine d'informations extrêmement précieuses pour tous les chercheurs de l'industrie pharmaceutique. Ce recours aux ressources naturelles devient alors une des plus importantes et intéressantes pistes à explorer pour la recherche de nouveaux produits antibactériens plus efficaces **(Wright et Sutherland, 2007)**.

En effet, ces plantes représentent une nouvelle source de composés actifs. Dans ce cadre les métabolites secondaires reste l'objet de nombreuses recherches *in vivo* comme *in vitro*, notamment la recherche de nouveaux constituants naturels tels que les composés phénoliques.

Parmi les plantes médicinales ayant un intérêt thérapeutique important figure le grenadier (*punica granatum L.*).

C'est un arbuste originaire de Perse qui a été très anciennement cultivé de par le monde, en particulier en Asie, en Afrique de Nord et sur le pourtour méditerranéen (**Bellakher, 2006**)

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 (**Panichayupakaranant et al., 2010 ; Hassan et al., 2013**). Ceci nous a amené à essayer de confirmer ou d'infirmer les hypothèses des populations rurales algériennes qui suggèrent l'efficacité du fruit (*punica granatum L.*) contre les maladies infectieuses, par une étude scientifique sur les variétés algériennes.

Donc notre travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation de notre patrimoine en plantes médicinales et l'évaluation de leurs activités biologiques. Notre objectif principal vise à démontrer la richesse du fruit (*punica granatum L.*) de variété Algérienne en polyphénols et à déterminer l'activité antibactérienne de leurs extraits phénoliques vis-à-vis des souches de *Staphylococcus aureus* isolées en milieu hospitalier.

Pour cela 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 une évaluation de l'activité antibactérienne de ces extraits par la méthode de diffusion en milieu solide.

Sommaire

Introduction.....	01
Chapitre 1 : Synthèse bibliographique.....	03
1. Généralités sur <i>Punica granatum L.</i>	03
2. Les polyphénols.....	09
3. Généralités sur <i>Staphylococcus aureus</i>	17
Chapitre 2 : matériels et méthodes.....	24
Chapitre 03 : résultats et discussion.....	37
1. Isolement et identification.....	37
2. L'étude de la sensibilité vis-à-vis des antibiotiques	39
3. Extraction	42
4. La sensibilité des souches vis-à-vis les extraits.....	43
Conclusion.....	50
Références bibliographiques	
Annexe	

1. Objectifs

Notre travail vise à extraire des constituants chimiques « les polyphénols » et d'évaluer *in vitro* l'activité antimicrobienne des extraits organiques et de l'extraits aqueux, préparés à partir du fruit *Punica granatum* vis-à-vis les staphylocoques dorés, pour cela nous avons fixé les objectifs suivants :

- ✓ Extraire des polyphénols du fruit *Punica granatum L.* par des solvants à polarité différente.
- ✓ Isoler, purifier et identifier les staphylocoques dorés à partir des différents sites.
- ✓ Étudier leurs sensibilités vis-à-vis des différents antibiotiques.
- ✓ Étudier de l'activité antimicrobienne des extraits par la méthode de diffusion en milieu solide.

2. Le lieu de travail

Notre étude a été réalisée au niveau ;

- Du laboratoire central de l'hôpital de koléa (EPH Kolea) pour la collection des *Staphylococcus aureus*.
- Au niveau du Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico – chimiques (CRAPC) de Bou-ismail pour l'extraction des polyphénols,
- Au niveau du Laboratoire de Tipaza CPS pour l'étude de l'effet antimicrobien durant la période de 10 mars au 15 juillet 2013.

3. Matériel

3.1. Matériel non biologique

Le matériel non biologique est représenté par : la verrerie, l'appareillage, les colorants et réactifs, les milieux de culture (voire annexe 01) les disques d'antibiotiques (voir annexe 05)

- **Les antibiotiques**

- a. *Antibiotiques utilisés pour le screening test* : Oxacilline : flacon de poudre injectable de 1g.

- b. **Antibiotiques utilisés pour l'antibiogramme standard** : Pour l'antibiogramme standard, nous avons utilisé les disques d'antibiogramme qui sont des papiers imprégnés par une concentration bien définie d'antibiotique. (Voire annexe 05).

3.2. Matériel biologique

- **10 souches** de *Staphylococcus aureus* isolées à partir de pus, pertes vaginales et des urines provenant de différents services de l'EPH de Koléa
- **Souches de références** : *S.aureus* ATCC 25923 sensible à l'oxacilline.
S.aureus ATCC 43300 résistant à l'oxacilline.
- Le plasma de lapin et les anticorps monoclonaux Pastorex Staph-plus (Bio méruix France) utilisés pour le test de la coagulase.

3.3. Matériel végétal

Des fruits mûrs de grenade (*Punica granatum*) ont été achetés auprès du marché de Koléa d'origine de koléa au mois d'octobre 2012, ensuite stockées au congélateur dans un emballage alimentaire.



Figure 04 : représentation de la variété de grenade utilisée dans le cadre de notre étude.

Les extraits polyphénoliques de la grenade ont été obtenus à partir de trois parties :

- ✓ **L'écorce** : le fruit a été pelé manuellement puis les écorces ont été séchées dans l'étuve à une température de 45°C pendant une semaine et broyée en poudre.
- ✓ **Les pépins (graines)** : séchés et broyés après une séparation manuelle.
- ✓ **La pulpe** recueillie sous forme de jus.



Figure 05 : les composants de grenade utilisés dans le cadre de notre étude.

4. Préparation des extraits phénoliques

Le but 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 des solvants organiques qui accélèrent et augmentent le rendement d'extraction.

4.1. Extraction des polyphénols par macération à l'eau (Murat Ku *et al.*, 2007)

Les extraits aqueux ont été obtenus par macération pendant 48 heures de 25 g de matériel végétal. Les filtrats obtenus sur papier filtre sont alors évaporés à l'aide d'un rotavapeur. Les résidus obtenus sont conservés à 4°C avant la réalisation des tests antibactériens.

4.2. Extraction par les solvants organiques (Debib *et al.*, 2013)

25g de chaque matériel végétal (**écorce, graine** : broyées de manière à ce que la surface de contact avec le solvant (Acétne 80% ou l'éther de pétrole) soit la plus grande possible et donc le rendement d'extraction soit le meilleur possible sans que le temps d'extraction soit trop long et **jus** «25 ml ») est d'abord macérée dans 250 ml d'éther de pétrole et l'acétone 80% . Après 24 heures d'agitation mécanique à température ambiante, le mélange est filtré et concentré au Rotavapeur à la température de 50°C pour l'éther de pétrole et 100°C pour l'acétone 80% afin d'obtenir l'extrait éther étherique et l'extrait acétonique.

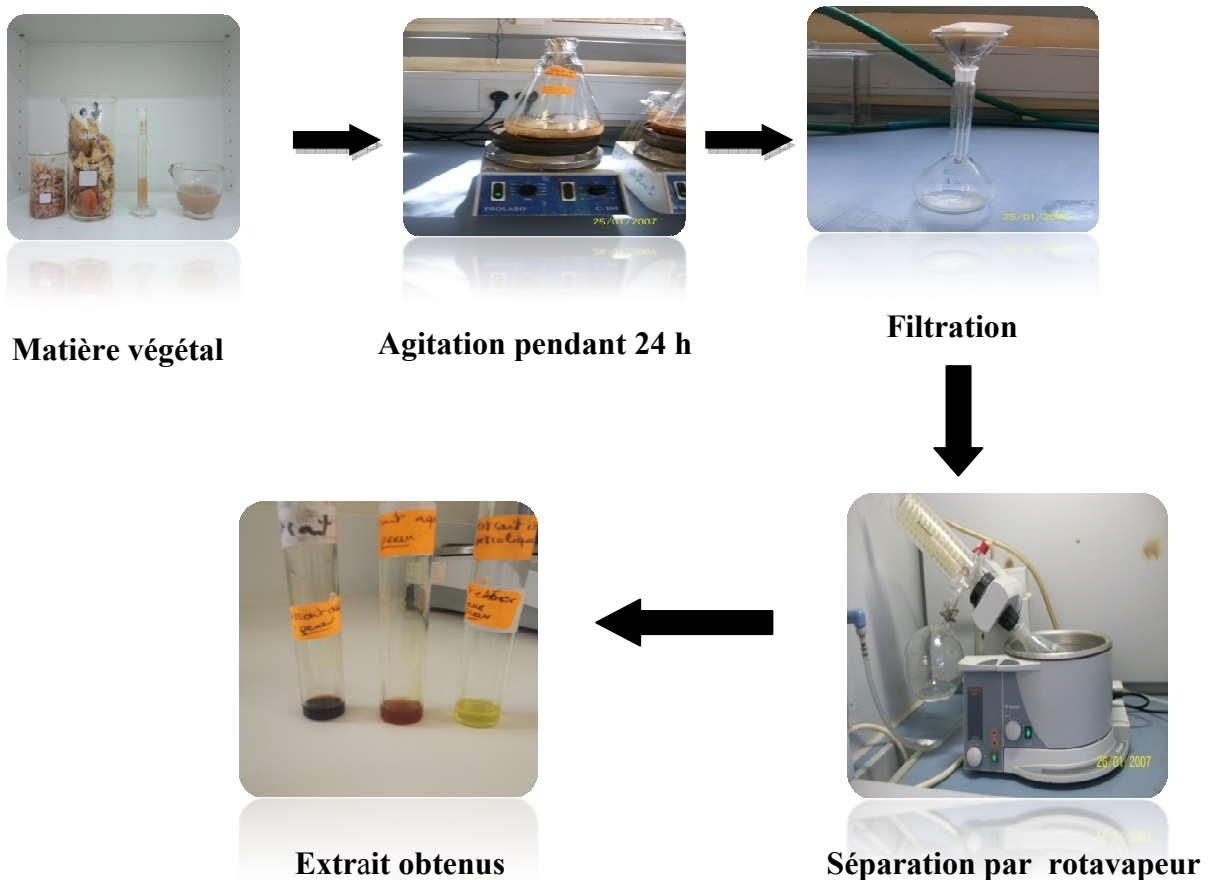


Figure 06 : Schéma représente les étapes d'extraction des polyphénols.

Les rendements d'extraction ont été calculés selon la formule suivante :

$$R = \frac{\text{Masse d'extrait obtenue}}{\text{Masse des grenades analysées}} \times 100$$

5. Isolement et identification des staphylococcus aureus :

5.1. Isolement

Nous avons reçu des prélèvements à type pertes vaginales, pus et urines qui ont été mise en culture.

Pour ce fait deux milieux ont été utilisé :

- Milieu usuel : Gélose nutritive convient à la culture des bactéries peu exigeantes
- Milieu sélectif : milieu Chapman (voir annexe 03).

Après l'isolement, les souches ont subi une série de repiquage pour s'assurer leur pureté, nous avons adopté la méthode des quadrants.

➤ *Technique (figure 07)*

- Tracer sur le fond extérieur de la boîte de pétri deux diamètres perpendiculaires séparant la boîte en quatre secteurs.
- Prélever à l'anse (stérile) la suspension bactérienne faite a partir d'une culture pure.
- Avec la main gauche maintenir entrouverte la boîte et étaler le prélèvement par stries très serrées dans une moitié de quadrant (quadrants 1 et 2)
- Flamber l'anse et laisser refroidir
- Étaler à nouveau le prélèvement par stries serrées dans la moitié correspondante aux quadrants 2 et 3.
- Flamber l'anse et laisser refroidir.
- Répéter une dernière fois l'étalement en stries serrées dans la moitié correspondante aux quadrants 3 et 4

On a donc réalisé un isolement en quadrants dont la richesse en Bactéries diminue du 1^{er} quadrant au 4^{ème}

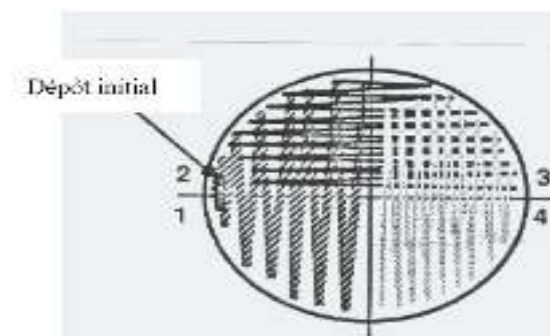


Figure 07 : Isolement des Souches par la méthode des quadrants

5.2. Identification

5.2.1. Etat frais

- **But** : Cette méthode permet l'observation des bactéries vivantes et la détermination de leurs : morphologies, de leurs modes de groupement, de leurs taille, de leur mobilité éventuelle et de la quantité approximative des bactéries (**Fauchère, 1997**).
- **Technique** : Sur une lame propre stérile, on dépose à l'aide d'une pipette Pasteur une colonie bactérienne et on ajoute une goutte d'eau physiologique. On recouvre la lame avec une lamelle et on observe au microscope optique (G : $\times 40$, $\times 100$).

5.2.2. Coloration de Gram

➤ **Principe**

La coloration de Gram est la méthode de coloration différentielle la plus importante pour le diagnostic bactériologique. 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**

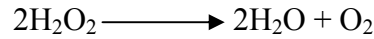
- A l'aide d'une pipette Pasteur stérile, on prélève une colonie bien isolée pour faire un étalement mince sur une lame porte-objet. Le frottis est fixé à la chaleur.
- Puis il est entièrement recouvert de violet de gentiane pendant 1 min. On rince ensuite à l'eau de robinet.
- Le frottis est ensuite 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 fuchsine pendant 20 s, puis lavé à l'eau et séché.

Ensuite le frottis est examiné au microscope optique à l'objectif 100 et à l'immersion

5.2.3. Identification biochimiques

a) Recherche de la catalase :

- **Principe** : Certaines bactéries possèdent une enzyme qui permet la décomposition de l'eau oxygénée en eau en oxygène gazeux (**Leyral, 1995**) catalysant la réaction :



- **Technique** : Sur une lame stérile, déposer une goutte d'eau oxygénée à laquelle on ajoute une colonie bien isolée.
- **Lecture** : La présence de catalase se traduit par l'apparition plus au moins rapide de bulles d'air dus à la libération de l'oxygène par les bactéries catalase positive.
- Catalase négative : absence de bulles d'air.
 - Catalase positif : dégagement d'oxygène sous forme de gaz. (voire annexe 02)

b) Test Mannitol-mobilité

- **Principe** : Le mannitol est un produit de réduction de D-Mannose, sa dégradation conduit à la formation de fructose, dont l'attaque aboutit à des acides à chaînes courtes qui acidifient le milieu entraînant le virage au jaune de l'indicateur de pH. L'aspect du milieu (semi-solide) permet de mettre en évidence le caractère mobilité par ensemencement en piqure centrale, la mobilité se traduit par un trouble qui diffuse de part et d'autre de la piqure centrale dans le milieu (**Djeloauat, 1990**)

- **Technique** : Le milieu utilisé est le mannitol-mobilité, semi solide au rouge de phénol. L'ensemencement se fait par piqure centrale jusqu'au fond du tube. L'incubation se fait à 37C pendant 24h à 48h.

- **Lecture** :

Lecture de la dégradation du mannitol :

- ✓ Réaction positive : virage du milieu du rouge au jaune ; le mannitol est fermenté. (voire annexe 02)
- ✓ Réaction négative : le milieu reste inchangé.

Lecture de la mobilité :

- ✓ Mobile : trouble de toute la masse.
- ✓ Immobile : culture le long de la piqure seulement.

c) Recherche de la coagulase

La coagulase libre ou staphylocoagulase est une enzyme capable de coaguler le plasma oxalaté ou citraté. Sa recherche est considérée comme un critère d'identification de *S.aureus*.

- **Principe :** On met en contact du plasma de lapin, incapable de se coaguler seul, avec un peu de bouillon cœur cervelle où a été cultivé le germe à étudier. Si le fibrinogène, soluble dans le plasma, se transforme en fibrine solide, alors un caillot se formera au fond du tube (**Leyral, 1995**).
- **Techniques :** on ajoute dans un tube sec 0.5ml d'une culture liquide de la souche à testé à 0.5ml du plasma de lapin. deux autres tubes sont préparés, l'un contient du plasma seulement et l'autre du plasma et une souche *S.aureus* de référence (ATCC 25923). le tube est maintenu à 37°C, observation après 3h puis 24h pour voir si un caillot est formé.
- **Lecture :**
 - a. Si le plasma coagule (présence d'un caillot) → *S.aureus*. (Voire annexe 02)
 - b. Si le plasma n'est pas coagulé → espèce autre que *S.aureus*.

Pour les tubes témoin : le tube contenant la souche de référence doit être positif, et l'autre est négatif, si non le test est à refaire.

d) Recherche de la cuagulase par le test PASTOREX™ STAPH-PLUS

La coagulase liée est mise en évidence par le PASTOREX™ STAPH-PLUS, un test rapide d'agglutination sur lame pour la détection simultanée du facteur d'affinité pour le fibrinogène (clumping factor). De la protéine A et des polysaccharides capsulaires de *Staphylococcus aureus*.

➤ **Principe :**

Le réactif PASTORX™ STAPH-PLUS permet la recherche simultanée :

1. Du facteur d'affinité pour le fibrinogène, également appelé coagulase liée ou (clumping factor).
2. De la protéine A qui possède une affinité pour le fragment cristallisable (Fc) des immunoglobulines gamma (IgG).
3. Des polysaccharides capsulaires de *Staphylococcus aureus*.

Ce réactif est constitué de particules de latex sensibilisées d'une part avec du fibrinogène et des IgG, et d'autre part avec des anticorps monoclonaux spécifiques des polysaccharides capsulaires de *Staphylococcus aureus*.

- **Technique** : Les isolats de *Staphylococcus aureus* sont mélangés avec les réactifs au latex sur une carte d'agglutination.
- **Lecture**: Après avoir bien mélangé, Si on a la formation d'agglutinats indique la présence de *Staphylococcus aureus* (Voire annexe 02). Si on n'a pas la formation des agglutinats l'identification correspond à une autre espèce autre que *S.aureus*.

d) Recherche de nitrate réductase

- **Principe** : Ce test consiste à mettre en évidence la présence ou non des nitrites dans le milieu de culture. S'ils sont présents, ils donnent une réaction colorée rouge en présence d'acide sulfanilique et de naphtylamine. Ces réactifs portent le nom de réactifs de GRIESS. En l'absence de nitrites, on va rechercher la disparition des nitrates par addition de zinc : en effet le zinc réduit les nitrates en nitrites. (**Farineau et Morot-Gaudry, 2011**)

Deux cas sont possibles :

- a. Coloration rouge : les nitrates encore présents dans le milieu ont été réduits en nitrites par le zinc et ont réagi avec les réactifs, la nitrate réductase est donc négative.
- b. Pas de coloration rouge : au contraire les nitrates du milieu ont été réduits par les bactéries et l'addition de zinc ne peut produire de nitrites. La nitrate réductase est donc positive jusqu'au stade azote.

- **Technique**

- Ensemencer un bouillon nitraté avec 2 gouttes de suspension bactérienne.
- Incubation pendant 24h à 37 °C.
- Ajouter 3 gouttes de chacun des réactifs NR 1 et 2.

Lecture :

- Le milieu devient rouge : présence de nitrites. Donc la bactérie possède une nitrate réductase. **Résultat NR+** —→ *Staphylococcus aureus*

-Le milieu reste inchangé : on ajoute alors de la poudre de zinc qui joue le même rôle que la nitrate réductase vis à vis des nitrates.

✓ Coloration rouge : on a donc eu transformation des nitrates en nitrites par le zinc. La bactérie ne possédait pas cette enzyme. **Résultat NR-**

✓ Pas de coloration : les nitrates ont été transformés par la bactérie au delà des nitrites. La bactérie possède cette enzyme. **Résultat NR+** —→ *Staphylococcus aureus* (voire annexe 02)

5.3. Etudes de la sensibilité de *S.aureus* vis-à-vis des antibiotiques

Pour l'antibiogramme standard nous avons testé la liste des antibiotiques recommandée pour l'étude de *S.aureus*. Ces tableaux fournis par le fascicule de standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale (médecine humaine et vétérinaire) selon les recommandations de l'OMS, 6^{ème} édition 2011 (AARN, 2008).

Ces antibiotiques sont indiqués dans le tableau (voire annexe 05). Antibiogramme se fait sur gélose Mueller-Hinton, coulée en boîte de pétri sur une épaisseur de 4mm.

➤ Inoculum

- A partir d'une culture pure de 18 à 24h sur milieu d'isolement approprié, racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées parfaitement identiques.
- Bien décharger l'anse ou l'écouvillon dans 5 à 10 ml d'eau physiologie stérile à 0.9%.
- Bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0.5 MF ou une DO de 0.08 à 0.10 lue à 625nm
- 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.

➤ Ensemencement

- Tremper un 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 gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées.

- Répéter l'opération deux 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.
- **Incubation** : 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.
 - Comparer les résultats obtenus aux valeurs critiques figurant dans les tables de lectures fournis par l'OMS. (voire annexe 04)

5.4. Recherche de la résistance à l'oxacilline (Test de screening à l'oxacilline pour *S.aureus*)

Pour l'antibiogramme de *S.aureus*, l'oxacilline doit être testée de façon particulière pour majorer l'expression de la résistance, et ce ci par la technique de screening test réaliser selon le fascicule standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle nationale 5^{ème} édition 2008 (**AARN, 2008**)

➤ **Préparation du milieu**

Gélose Mueller-Hinton additionnée de 4% de NaCl et de 6ug/ml d'oxacilline. La préparation de la solution d'oxacilline se fait de la manière suivante:

- Diluer 6mg d'oxacilline (poudre injectable d'un flacon de 1g) dans 10ml d'eau distillée stérile, puis faire une dilution au deuxième. Répartir la solution obtenue à raison de deux ml par tube.

- Mettre 2ml de cette solution dans une boîte de 90mm de diamètre, ajouter 18ml de gélose Mueller-Hinton hypersalée. Mélanger en faisant des mouvements rotatoires.
- laisser solidifier puis sécher.

➤ **Inoculum**

- A partir d'une culture pure de 18h sur milieu d'isolement, racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.
- Décharger l'anse dans 5 à 10ml d'eau physiologique stérile à 0.9%.
- Bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0.5 MF ou une DO de 0.08 à 0.10 lue à 625nm
- 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.

➤ **Ensemencement** : L'ensemencement se fait par spot, en appliquant verticalement sur la gélose l'extrémité d'un écouvillon trempé dans la suspension bactérienne (ou ensemencher un cadran entier).

➤ **Résultats** :

Présence de culture → MRSA.

Absence de culture → MSSA. (Voire annexe 04)

5.5. Sensibilité de *S.aureus* vis-à-vis des extraits en milieu solide

Afin d'évaluer l'activité antimicrobienne des extraits polyphénoliques, nous avons utilisé la méthode de diffusion en milieu gélosé (NCCLS, 2005)

Le principe de cette méthode est d'utiliser des disques de papier Whatmann de 9mm de diamètre. Les disques ont été imprégnés par 50µl de la solution des extraits dissous dans le DMSO (dimethylsulfoxide) pour les extraits organiques, et dans l'eau distillée stérile pour l'extrait aqueux (un disque imbibé par le DMSO a été employé en tant que contrôle négative). Puis déposés à la surface d'un milieu écouvillonné par une suspension microbienne d'une densité optique de 0.5Mc Farland. A la fin la durée d'incubation (18-24 heures pour les

souches bactériennes et 48 h pour la levure à 37 °C), les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés.

SECTEUR SANITAIRE DE KOLEA
LABORATOIRE CENTRAL
UNITE DE MICROBIOLOGIE

FICHE DE RENSEIGNEMENTS

1. IDENTITE DU MALADE :

N° D'ORDRE :

NOM PRENOM DATE DE NAISSANCE/AGE

Nom de jeune fille
Pour les femmes mariées

Sexe : Externe : Ensemble : OUI NON

Hospitalisé : Date d'hosp.

Profession : Service

Adresse
Personnelle : Hôpital

Wilaya : Wilaya

2. PRELEVEMENTS :

Nature Nbre :

Date de prélèvement : Heure de prélèvement :

3. RENSEIGNEMENTS CLINIQUES CL. DIAGNOSTIC :

--

4. TRAITEMENT A.T.B :

Traitement A.T.B reçu OUI NON

Nom de l'A.T.B	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Date de Début	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Durée	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

N.B : Tout prélèvement sans fiche de renseignements bien remplie sera refusé

Signature et cachet du médecin traitant

Fiche de renseignements cliniques (hôpital de Kolea).

Ce chapitre présente tous les résultats obtenus au cours de notre recherche ainsi que leurs interprétations et discussions.

1. Isolement et identification

Après une durée de 2 mois de travail, Au cours de laquelle, 10 souches de *Staphylococcus aureus* ont été isolées et identifiées.

1.1. Aspect macroscopique de *Staphylococcus aureus*

L'isolement de *Staphylococcus aureus* a été effectué sur gélose de Chapman c'est un milieu sélectif pour *S. aureus* (fortes concentrations salines 75% de NaCl). Les colonies apparaissent sous forme arrondies, bombées, lisses, pigmentés en jaune, opaque, dorées et brillantes. Leur diamètre est de 1 à 3mm.

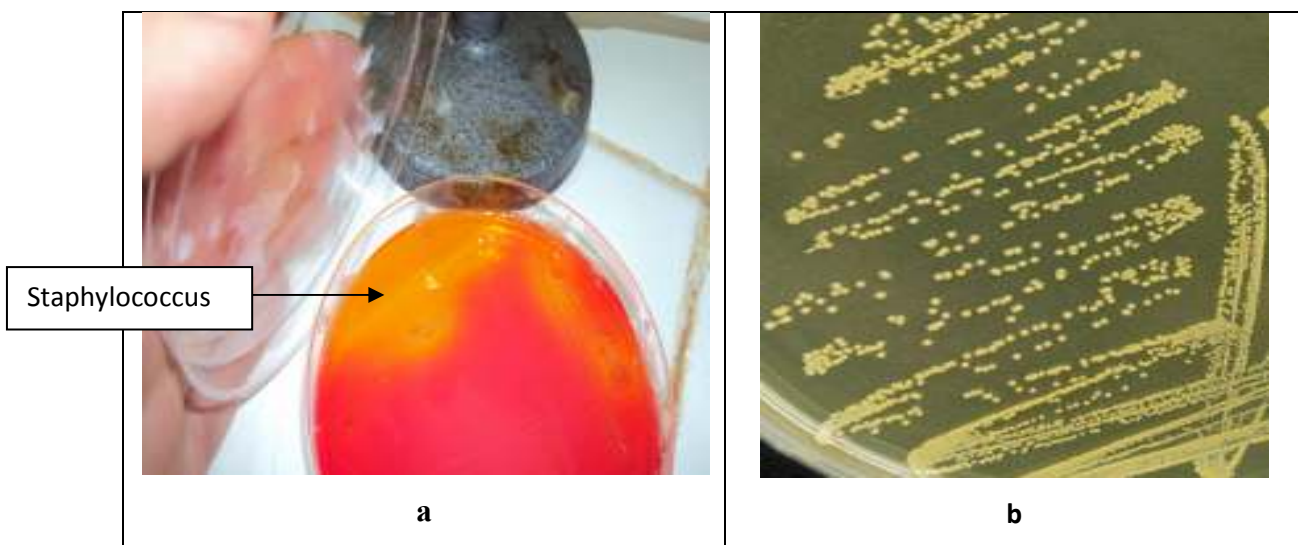


Figure 08: Aspect macroscopique de *S.aureus* sur gélose Chapman (a) et sur gélose nutritive (b)

1.2. Aspect microscopique de *Staphylococcus aureus*

1.2.1. État frais

S.aureus se présente sous l'aspect de cocci immobile.

1.2.2. Coloration de Gram

L'observation microscopique de la coloration de Gram de *S.aureus* nous a permis de distinguer des cocci en petit amas <<grappe de raisin >>, en diplocoques ou en très courtes chaînettes (3 à 5 éléments), positivement colorés au Gram. (Coloration violet)

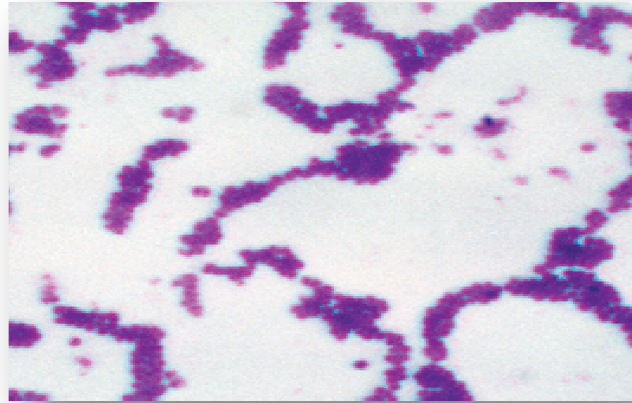


Figure 09 : La coloration de Gram de *Staphylococcus aureus* (X100).

1.3. Identification biochimique

Après l'isolement et la purification des souches sur Chapman, l'identification biochimique par une minigalerie classique nous a confirmé le genre et l'espèce *S.aureus*.

Tableau IV : Les résultats des tests biochimiques de *Staphylococcus aureus*.

Tests biochimique	Aspect après incubation	Interprétation
Mannitol/Mobilité	coloration jaune croissance seulement autour de la pique	Mannitol + immobile
Catalase	dégagement de bulles d'aires	+
Recherche de coagulase	(+) coagulation de plasma	Coagulase +
Recherche nitrate réductase	(+) virage de couleur vers le rose ou reste transparente après l'addition de Zinc	nitrate reductase +

2. L'étude de la sensibilité vis-à-vis des antibiotiques

L'interprétation de l'antibiogramme (sensible, intermédiaire et résistante) a été faite conformément aux recommandations de la société française de microbiologie 2010 et le ministère de la santé et de la population Algérienne (AARN, 2008).

Les résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous :

Tableau V : Résultats de l'antibiogramme de *Staphylococcus aureus* à partir de différents prélèvements.

	Diamètres d'inhibitions/résistance															
	P	OX	FOX	k	OFX	GN	VA	DA	E	TE	SXT	RA	C	FF	FA	PT
<i>U5</i>	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R	R	S
<i>N1</i>	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Pus1</i>	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Pus2</i>	R	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Pus3</i>	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S
<i>Pus4</i>	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
<i>Pus5</i>	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Pus6</i>	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Pv2</i>	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Pv3</i>	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

R : Résistante, S : Sensible,

L'antibiogramme des ces souches est suivie par un screening test pour but de détecter la résistance de *S.aureus* à l'oxacilline.

Les résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous :

Tableau VI : résultats de screening test.

U5	MSSA	souche sensible à l'oxacilline
N1	MRSA	souche résistante à l'oxacilline
Pus1	MSSA	souche sensible à l'oxacilline
Pus2	MSSA	souche sensible à l'oxacilline
Pus3	MRSA	souche résistante à l'oxacilline
Pus4	MRSA	souche résistante à l'oxacilline
Pus5	MRSA	souche résistante à l'oxacilline
Pus6	MSSA	souche sensible à l'oxacilline
Pv2	MSSA	souche sensible à l'oxacilline
Pv3	MSSA	souche sensible à l'oxacilline

A partir de ces résultats nous remarquons qu'il ya 2 types de souches de *S.aureus* : les souches sensibles à l'oxacilline (MSSA) et les souches résistantes à l'oxacilline (MRSA).

Parmi les 10 souches isolés, 6 étaient sensibles à l'oxacilline et 4 étaient résistants à l'oxacilline.

En observant les résultats présentés dans la figure 10, nous remarquons que toutes les souches sont résistantes à la pénicilline G (Test de trèfle) et sensibles a la vancomycine (VA), Clindamycine (DA), Trimethoprime/sulfamethoxazole (SXT), Rifampicine (RA), Chloramphénicol (C), Pristinamycine (PT). Nos résultats corroborent avec ceux de **Daurel** et **Leclercq (2010)** qui ont confirmé que la résistance de *S aureus* aux glycopéptides tels que la vancomycine est rare ainsi que la teicoplanine.

Les autres antibiotiques : Kanamycine (K), Ofloxacine (OFX), Cefoxitine (FOX), Gentamycine (GN), Oxacilline (OX), Erythromycine (E), Tetracycline (TE), Acide fusidique (FA), Fosfomycine (FF) possèdent une résistance variables selon l'origine des souches dont la résistance de ses souches est acquise.

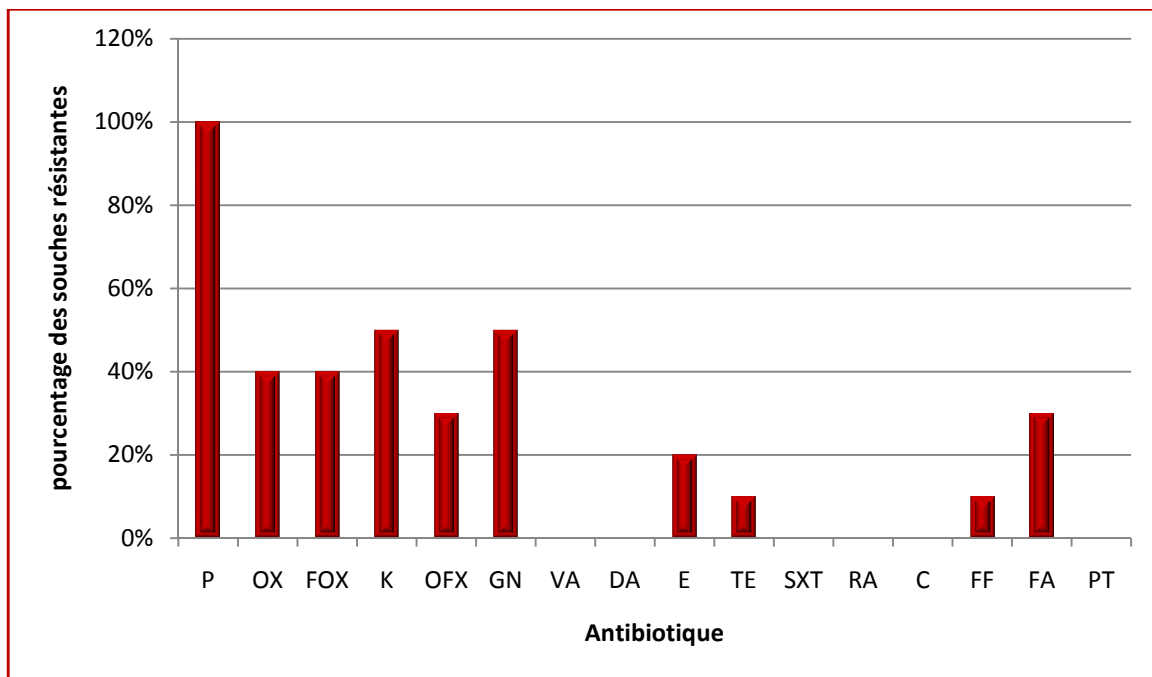


Figure 10 : Fréquences des souches résistantes aux antibiotiques testés

3. Extraction

Pour choisir un solvant très efficace pour notre échantillon, et selon la recherche bibliographique qui suggère que la méthode d'extraction doit permettre l'extraction complète des composés d'intérêt et doit éviter leur modification chimique (**Turkmen et al., 2007**),

Nous avons testé trois solvants à polarité différente : l'éther de pétrole, l'acétone et l'eau distillée.

3 parties de la grenade ont été utilisées : le jus, l'écorce et le pépin.

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

Il ressort de l'analyse des résultats illustrés si dessous, que les meilleurs rendements ont été obtenus par l'extrait acétonique où on note un pourcentage élevé de 54.56% pour l'écorce, 19.42% pour le pépin et 13.52% pour le jus suivit par l'extrait aqueux où on note aussi un pourcentage de 33.52% pour l'écorce, 12.33% pour le pépin et 5.8% pour le jus. Alors que l'extrait étherique se caractérise par le rendement le plus faible..

Ces résultats concordent 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**).

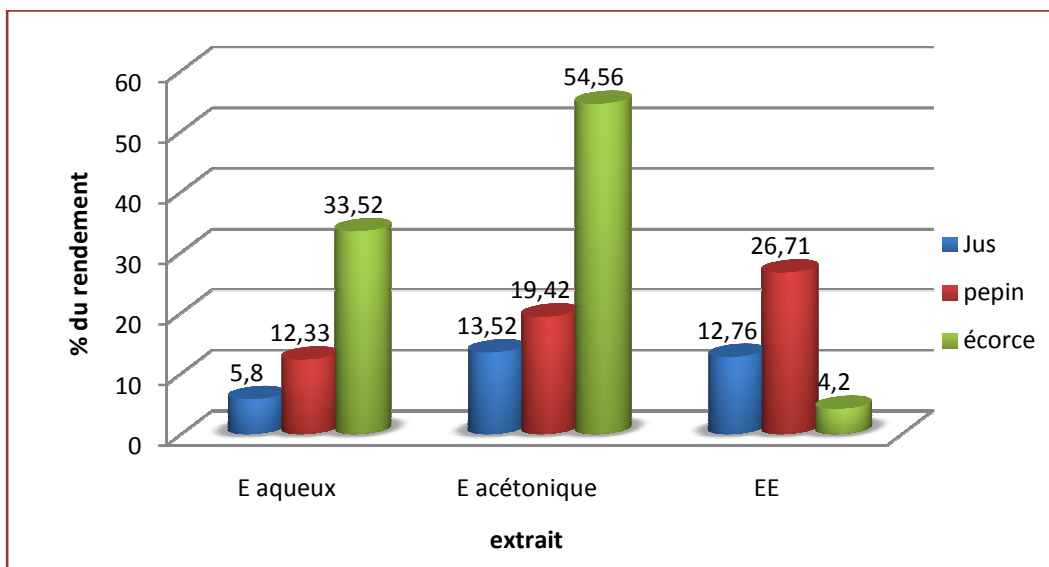


Figure 11: le rendement d'extraction des extrais phénoliques.

4. La sensibilité des souches vis-à-vis des extraits

L'activité antimicrobienne s'est manifestée par l'apparition des zones d'inhibition autour des disques imprégnés d'extrait étudié.

L'essai antibactérien a été réalisé par la méthode de diffusion sur gélose (NCCLS, 2005).

Pour éliminer la présence d'un effet antibactérien éventuel des solvants utilisés dans l'extraction (l'éther de pétrole et l'acétone) sur la croissance normale de nos souches, nous avons testé des disques imprégnés de 50µl de chaque solvant sur des boîtes ensemencées avec nos souches. Les résultats de ces tests préliminaires nous ont confirmés l'absence totale de l'activité antibactérienne des solvants utilisés.

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).

Le diamètre de la zone d'inhibition diffère d'une souche à une autre et d'un extrait à un autre (figure 12, 13 et 14). Il apparaît que toutes les souches testées sont inhibées au moins par l'un des extraits, ce qui confirme le spectre large de l'activité antimicrobienne de ce fruit.

Selon nos résultats, les extraits préparés ont une activité très variable, ils s'attaquent aux souches testées avec une intensité différente selon la concentration et le type de l'extrait testé, les souches testées et leur site de prélèvements.

Les résultats obtenus sont représentés sous forme d'histogramme.

4.1. Effet antibactérien des extraits du jus (pulpe)

L'effet inhibiteur des différents extraits du jus montre un pouvoir antibactérien sur tous les souches étudiées avec des diamètres variant de 12 mm à 20 mm dont la plus sensible est la souche *S.sureus* isolée a partir de pus (Pus1) avec un diamètre de 20 mm et les souches les moins sensibles sont les MRSA (N1, Pus3, Pus4, Pus5) due a l'acquisition des gènes de résistance comme le *mecA* ou d'autre suite a l'utilisation abusive des antibiotiques.

L'extrait étherique à signaler l'effet le moins efficace par rapport aux autres extraits par une moyenne de 10,7 mm.

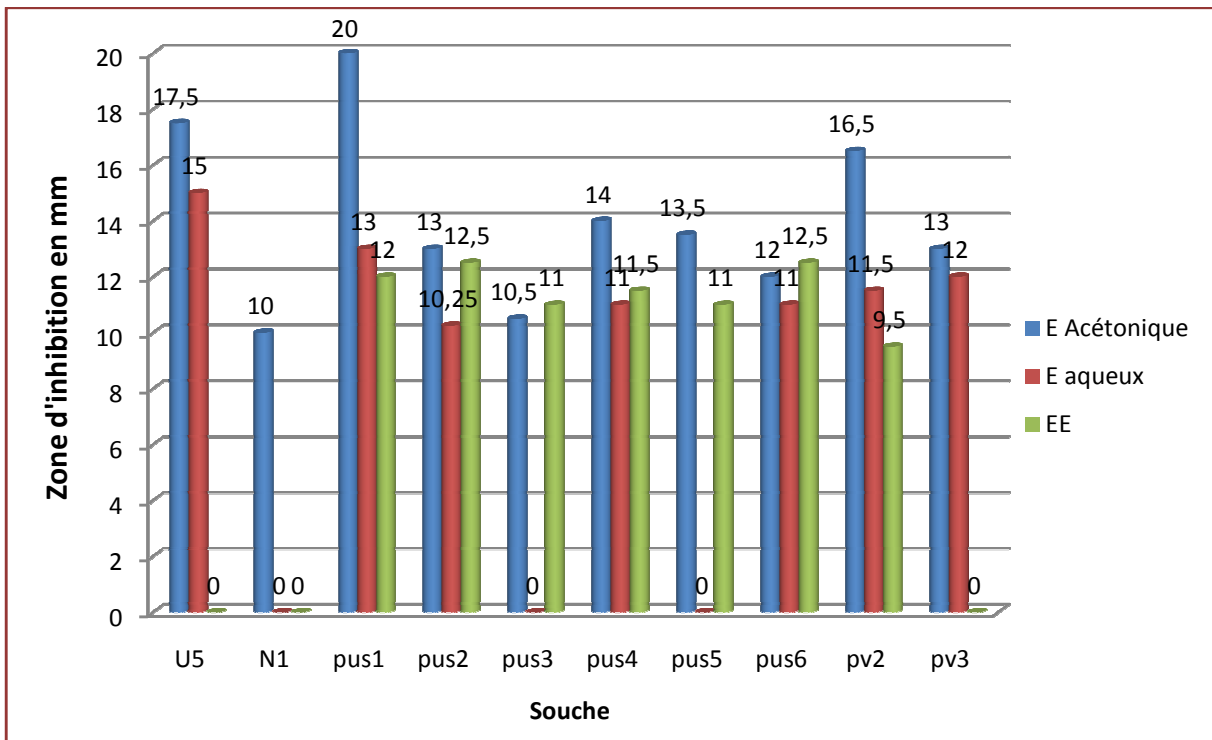


Figure 12: Diamètres des zones d'inhibition des 10 souches de *S.aureus* testées vis-à-vis des extraits du jus.

4.2. Effet antibactérien des extraits de pépin

Concernant l'effet des différents extraits de pépin on remarque que cette partie de grenade ne possède aucun effet inhibiteur sur les souches testées puisque les diamètres de l'inhibition sont inférieurs à 12mm.

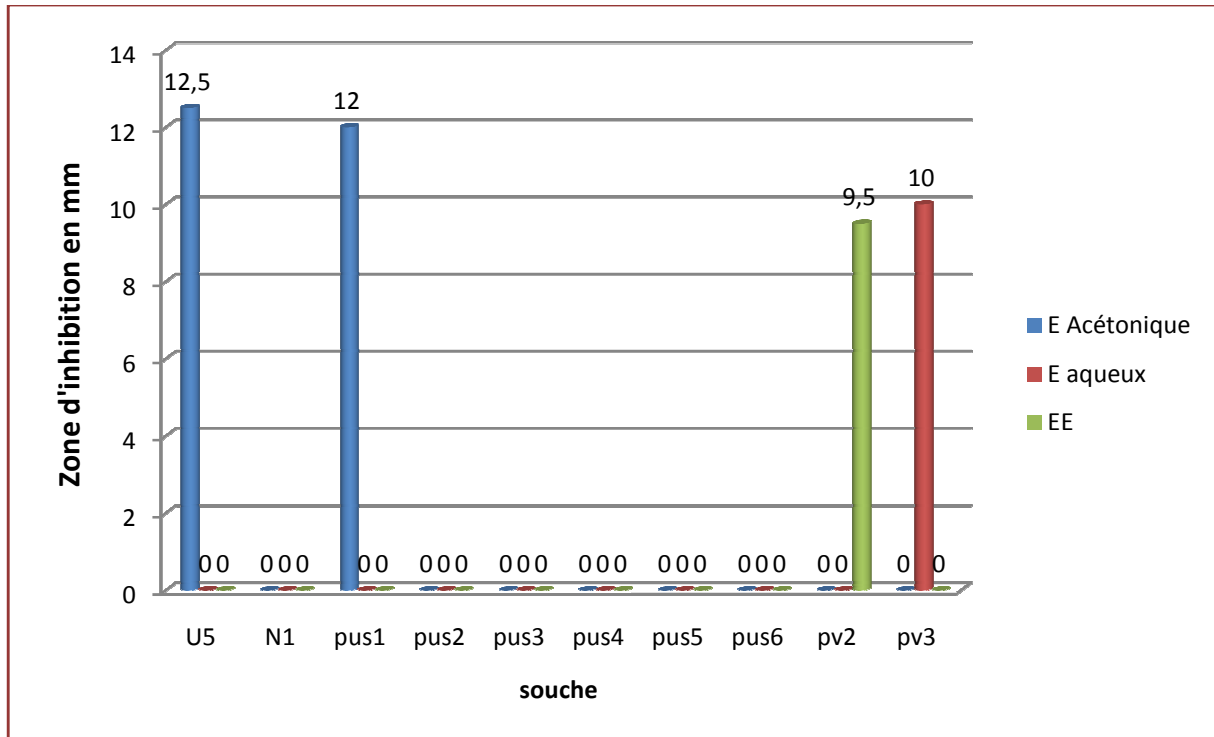


Figure 13 : Diamètres des zones d'inhibition des 10 souches de *S.aureus* testées vis-à-vis des extraits du pépin.

4.3.Effet antibactérien des extraits de la peau

D'après nos résultats obtenus de l'aromatogramme on remarque que les diamètres des zones d'inhibition varient entre 12mm à 29mm, qui indique un large intervalle d'inhibition pour cette partie de la grenade. La valeur maximale a été notée pour l'extrait acétonique et aqueux avec des diamètres de 29 mm et de 28.5mm respectivement sur *S.aureus* d'origine urinaire (U5).

L'extrait acétonique et aqueux de l'écorce ont une action inhibitrice très importantes sur les 10 souches testés où le diamètre varie de 20 mm à 29 mm. Par ailleurs, on remarque que l'extrait étherique de l'écorce n'a aucune action inhibitrice sur les 10 souches testées avec un diamètre inférieur à 9 mm.

Nos résultats sont difficilement comparables avec ceux de la bibliographie étant donné que les méthodes utilisées sont différentes, le choix du protocole d'extraction et plus particulièrement celui du solvant est très important.

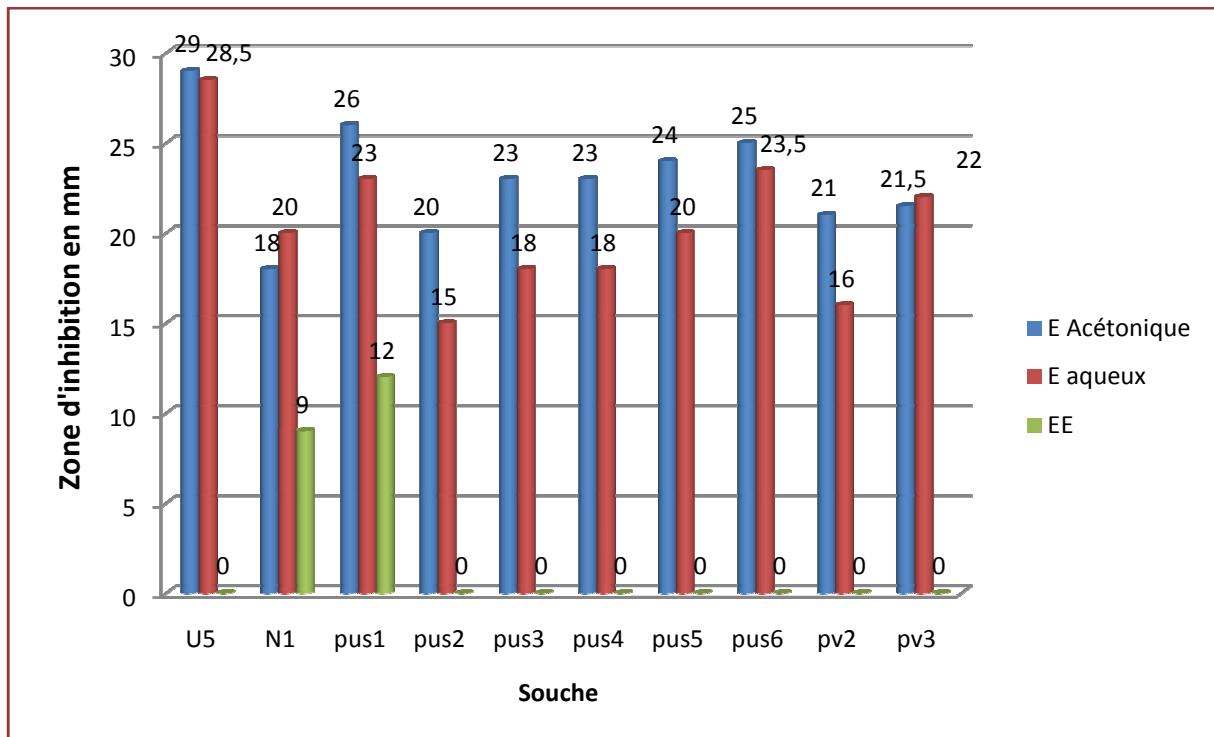


Figure 14: Diamètres des zones d'inhibition des 10 souches de *S.aureus* testées vis-à-vis des extraits de l'écorce.

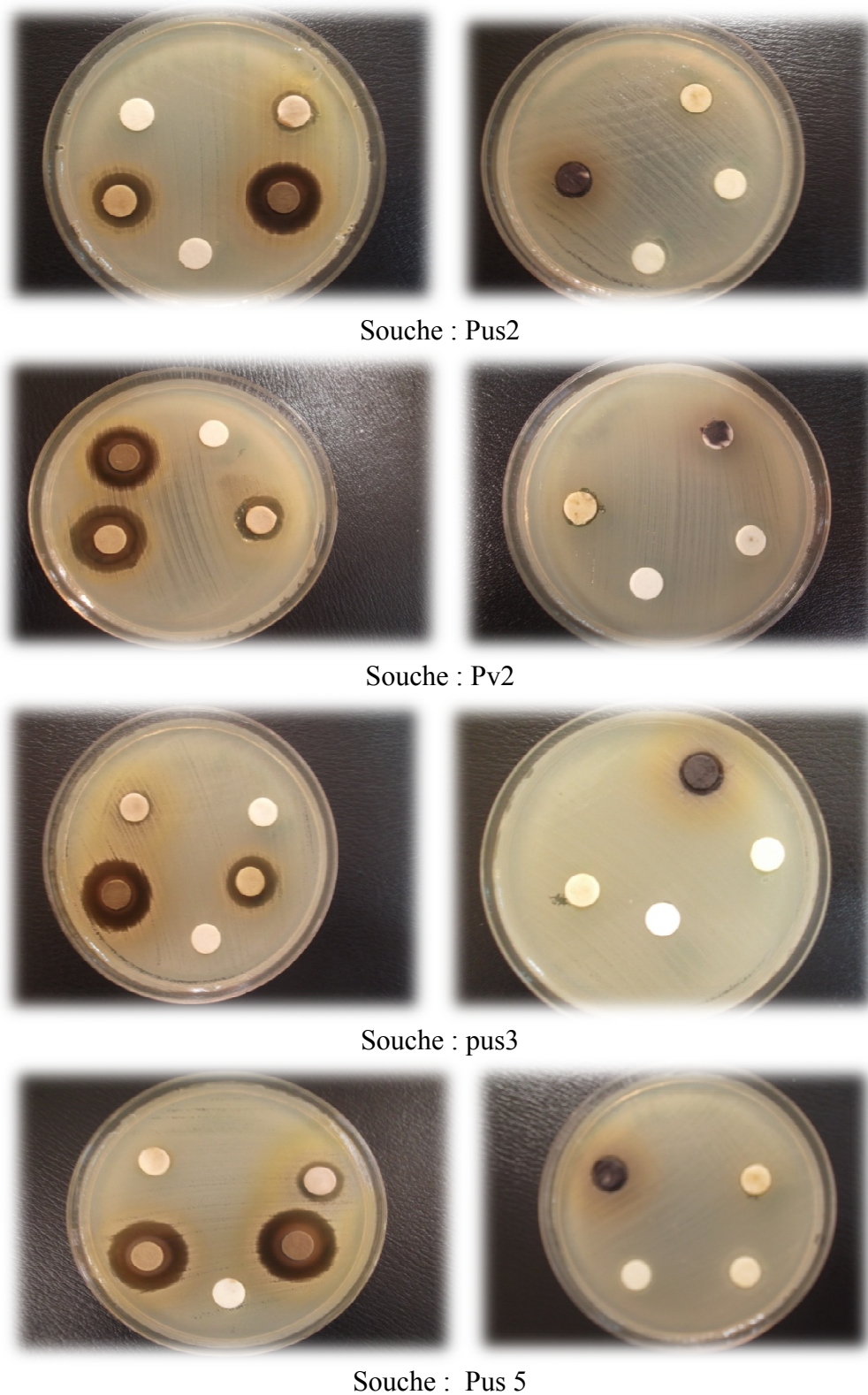


Figure 15 : quelques résultats de l'effet antibactérien des extraits du fruit *Punica granatum*

Selon **Rojas et al. 1992** et **Marjorie, 1999**, 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 .

La variation de la composition chimique explique donc les variations observées dans l'activité antimicrobienne des extraits d'une même plante ou de plantes différentes. 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**).

Nos résultats révèlent des réponses variables en fonction des souches, de la concentration, 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'adhérences microbiennes, la synthèse de certains enzymes et protéines membranaires de microorganismes par leur complexité avec les polysaccharides, leur capacité de ce fixer a des substrats tels que les sels minéraux, vitamines et glucides ce qui les rende indisponibles pour les micro-organismes (**Stern et al, 1996 ; Shahidi et Nacsck, 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).

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 des ces propriété physique.

D'un autre point de vue, *Punica granatum* montre que l'écorce du fruit a une plus grande activité microbienne que la pulpe et la graine (voir figure 13,14 et 15).

Ces résultats sont corrélatives avec l'étude réalisée par Surveswaran sur 133 plantes médicinales indiens à partir de 64 familles qui suggère que la peau contienne une valeur très élevés de tanins hydrolysables (punicalagine, punicalin et des acides gallagic) pourraient exercer des effets antibactériennes plus forte par rapport à la graine (Ajaikumar *et al.*, 2005).

A la lumières de tous ces résultats, Les différentes activités antibactériennes trouvées peuvent être attribuées aux plusieurs facteurs tels que les facteurs inhérents (variété, conditions ambiantes, facteurs écologiques, variations saisonnières), les méthodes d'extraction (Moreira *et al.*, 2005 ; Sagdic *et Ozcan* 2003 ; Celiktas *et al.*, 2007a, Turkmen *et al.*, 2007), préparation de l'extrait, solvant utilisé, la sensibilité des bactéries (Loziene *et al.*, 2007), et finalement l'organe de la plante utilisé (Natarajan *et al.*, 2005).

Nos résultats préliminaires montrent que les extraits testés possèdent une activité antibactérienne *in vitro*. D'autres études approfondies et auraient pour objectifs de répondre aux points suivants:

- ✚ Obtenir une vue globale sur l'activité antibactérienne des extraits testés *in vivo* et *in vitro*.
- ✚ Isolement et caractérisation des composés actifs dans les différents extraits par des méthodes plus spécifiques
- ✚ Evaluation d'autres effets biologiques *in vitro* comme *in vivo* des extraits bruts et de leurs composés actifs en utilisant différentes techniques.

Conclusion

Les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substance et composés naturels bioactifs, l'utilisation de ces derniers en phytothérapie a reçu un grand intérêt dans la recherche biomédicale et devient aussi importante que la chimiothérapie.

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

Dans ce travail, on a tenté de déterminer l'effet antibactérien des différents extraits du fruit de *Punica granatum* plante largement utilisée en médecine traditionnelle à travers le monde.

De point de vue phytochimique, nous avons réalisé une extraction générale dont le plus grand rendement est observé avec les extraits polaires (eau et acétone) allant de 5.8 à 54,56% par rapport aux extraits apolaires (éther de pétrole) qui montre une rentabilité moins importante allant de 3 à 26%.

L'évaluation de pouvoir antibactérien a révélé que les extraits phénoliques possèdent un pouvoir antibactérien sur la souche *Staphylococcus aureus*. Cet effet est bien marqué surtout par l'extrait dérivé de l'écorce.

1. Généralités sur *Punica granatum L.*

Depuis des milliers d'années, le grenadier (*Punica granatum*), ses fruits ainsi que ses graines, son écorce et ses fleurs, sont utilisés, au Moyen-Orient et en Asie, régions dont cet arbuste est originaire, pour leurs propriétés médicinales. **(Benzi, 1999).**

D'abord disséminé par les nomades arabes, puis introduit en Chine au début du IIème siècle avant JC, le grenadier est importé à Rome par les Romains de retour des guerres puniques, après leur victoire sur les Carthaginois. Plus tard, le grenadier sera introduit dans la péninsule ibérique, où le nom de son fruit, la grenade, sera donné à l'une des plus grandes villes d'Espagne **(Wald, 2009).**

Ce fruit est mentionné dans le livre sacré du coran **(Ajaikumar, 2005)**

Utilisé, de façon empirique, dans les médecines traditionnelles pour soigner les maladies gastro-intestinales et les affections parasitaires, le grenadier fait son apparition dans la pharmacopée française en 1818. Abandonné ensuite en raison de la toxicité de certains de ses principes actifs, le grenadier fait l'objet, depuis une dizaine d'années, d'un regain d'intérêt, tant sur un plan médical et pharmacologique que sur un plan cosmétologique **(Wald, 2009).**

1.1. Répartition géographique

Le Grenadier *Punica granatum L.*, vient sans doute de la Perse, mais il était déjà cultivé avant l'époque historique pour la beauté de ses fleurs et pour ses fruits comestible. Naturalisé sur les rivages de la méditerranée, il est cultivé en Europe méridionale, dans les oasis algérienne et dans les régions arides de la Californie, de l'Arizona et du Mexique septentrional. C'est dans ces régions à la fois sèches et chaudes qu'il fournit les meilleurs fruits mais ceux-ci ne grossissent que si la saison humide coïncide avec leur formation **(UNESCO, 1960).**

1.2. Classification de *Punica granatum*

Le grenadier (*Punica granatum*) a été décrit par Linné et introduit dans sa classification en **1753** (Tableau 01).

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 représentée dans le tableau 01 (**Spichiger et al., 2004**)

Il convient donc de retenir que dans cette nouvelle classification, la famille des Punicacées n'existe plus. Le grenadier appartient alors à la famille des Lythracées, famille comportant 30 genres et 600 espèces (**Spichiger et al., 2004**).

Tableau I : Classification de *Punica granatum* (**Spichiger et al., 2004**)

Embranchement	Classification 1753	Classification 2003
	Spermaphytes	Angiospermes
Sous-embranchement	Angiospermes	Dicotylédones vraies
Classe	Magnoliopsida	Rosidées
Ordre	Myrtales	Myrtales
Famille	Punicaceae	Lythraceae
Genre	<i>Punica</i>	<i>Punica</i>
Espèce	<i>Punica granatum</i>	<i>Punica granatum</i>

1.3. Autres dénominations

1.4.1. Synonymes

L'espèce *Punica granatum* est mieux connue sous le terme de grenadier.

Grenadier est synonyme de : Balaustier, Miouganier, Arosse, Granatier, Migranier, Miougranié et Baloufié.

De même, la fleur du grenadier est également appelée balauste (**Planchon et Collin, 1875**).

Aussi, le fruit du grenadier, porte quelquefois le nom de : Pomme vénitienne, Pomme grenade et Pomme de Carthage.

Quant au mot malicorium, il désigne l'écorce du fruit du grenadier (**Planchon et Collin, 1875**).

1.4. 2. Les dénominations communes dans différentes langues

Selon les langues parlées dans chaque pays, le nom vernaculaire de *Punica granatum* varie. Ainsi le nom de cet arbre sera :

- ° En arabe : الرمان
- ° En anglais : Pomegranate ou Pome Granate.
- ° En allemand : Granatapfelbaum, Granatbaum, Gemeine Granat, Balluster.
- ° En espagnol : Granada coltivatedo, Mangrano.
- ° En italien : Granato.
- ° En chinois : Ngan Che Lieou, Shi Liu (**Verbois, 2009**).

1.4. Description botanique de grenadier

Punica granatum est un petit arbre ou un arbuste pouvant atteindre 2 à 6 m de haut, caducifolié à branches nombreuses et minces, ascendantes, parfois érigées aux rameaux souvent épineux. Les feuilles ont un pétiole très court et sont entières, opposées, oblongues-elliptiques (**Godet, 1991**).

Les fleurs rouge pourpre ou grenat, d'aspect froissé, portées par un courte pédoncule, solitaires à l'aisselle des feuilles ou réunies par groupe de deux ou trois de sommet des branches, s'ouvrent de mai à juillet (**Garnier, 1961**), sont actinomorphes et hermaphrodites (**Courchet, 1897**), la corolle comporte 5 – 7 pétales écarlates et abrite de nombreuses étamines (**Baum, 1988**). Le fruit sphérique à oblong, brun rougeâtre ou jaunâtre, à un calice épais. Des graines nombreuses, anguleuses, au tégument rouge, translucide et juteux, sont renfermées dans deux séries de loges séparées par des parois minces.

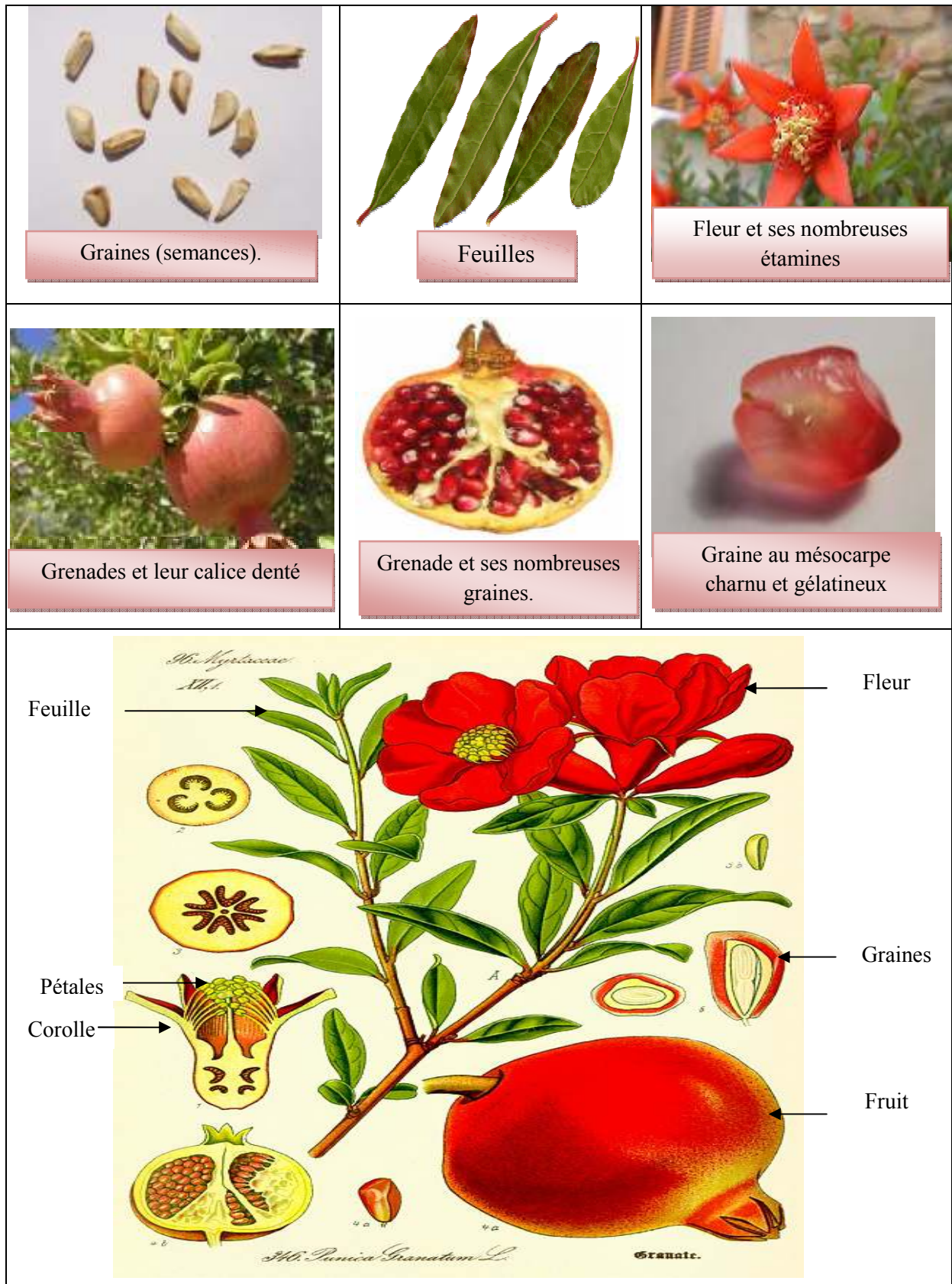


Figure 01 : Caractéristiques botaniques du grenadier

1.5. Valeur nutritionnelle

Déjà au XIXème siècle, le grenadier suscite un intérêt chez les chercheurs qui, avec des moyens très rudimentaires, ont ainsi mis en évidence certains principes actifs de cet arbre, tel que la pelletierine. Grâce aux relativement récents procédés d'analyse chimique, comme les techniques de chromatographie, de résonance magnétique ou encore de spectrométrie de masse, il a été possible d'identifier avec précision la composition des différents organes du grenadier synthétisée dans le tableau 02 (**Sepúlveda et al., 2010**).

La grenade est une bonne source de fibres alimentaires et de folate et une très bonne source de vitamine C.

Tableau II : Valeurs nutritionnelles de la grenade, pour 100g de portion comestible (USDA, 2002).

Grenade fraîche, pulpe et pépins (valeur nutritive pour 100 g)			
eau : 81 g	fibres : 1 g	valeur énergétique : 74,2 kcal	valeur énergétique : 315 kJ
protéines : 0,95 g	lipides : 0,3 g	glucides : 16,2 g	sucres simples : 16,2 g
Sels minéraux et oligo-éléments			
potassium : 259 mg	phosphore : 8 mg	calcium : 3 mg	magnésium : 3 mg
sodium : 3 mg	fer : 300 µg	zinc : 120 µg	cuivre : 70 µg
Vitamines			
vitamine C : 11,4 mg	vitamine B1 : 30 µg	vitamine B2 : 30 µg	vitamine B3 : 300 µg
vitamine B5 : 590 µg	vitamine B6 : 200 µg	vitamine B9 : 6 µg	vitamine B12 : 0 µg
bêta-carotène : 20 µg	rétinol : 0 µg	vitamine E : 0,55 mg	vitamine D : 0 µg

1.6. Propriétés thérapeutiques

La grenade renferme de nombreuses vertus : hémostatiques, anti-inflammatoire, antivomitique, antidiarrhétic, antihémorragiques, antidysentériques, antirhumatismales, emménagogues, antibactériennes, apéritive, échauffante, tonique et refroidissante, elle est l'un des fruits les plus appréciés en Inde tant par ses qualités alimentaires que pour ses capacités curatives (**Bernard, 2001**).

Consommée en prévention, elle possède des capacités anticancéreuses, ses propriétés thérapeutiques freinant la croissance de certains cancers (prostate, sein). Tonicardiaque, elle renforce l'énergie du cœur, dissipe l'amertume, dissémine les douleurs et les regrets (**Verbois, 2009**).

Elle régénère les tissus, réduit la pression sanguine systolique et son action astringente agit de façon excellente sur sphère intestinale, qu'elle revivifie. En même temps que l'un des meilleurs remèdes contre le ténia, ou ver solitaire et capable, en décoction, sous forme de tampons vaginaux, de maîtriser des leucorrhées et autres affections vaginales (**Verbois, 2009**).

De ces graines on extrait une boisson appelée « sambu », utilisée dans les cures de réjuvenation et de drainage interne, facilitant ainsi l'élimination des surcharges pondérales générées par une désaffection relationnelle ou parentale (**Wald, 2009**).

1.7. Toxicité du grenadier

L'écorce du grenadier, au XIXème siècle, souvent utilisée pour ses propriétés antihelminthiques, semble montrer quelques effets secondaires non négligeables. Ainsi, après administration d'une décoction d'écorce de racine, il fut observé, chez plusieurs patients, l'apparition de vertiges, d'étourdissements, d'une sorte d'ivresse, parfois des syncopes, et de légers mouvements convulsifs. Cependant, ces accidents étant fugaces et ne laissant aucune trace après leur manifestation, ils furent tolérés par les médecins de l'époque (**Wald, 2009**).

2. Les polyphénols

2.1. Généralités

Le terme polyphénol est introduit en 1980. Il remplace le terme ancien de **Tanin végétal**. De la lignée des grandes familles de molécules largement présentes dans le règne végétal, on retrouve tout un panel de composés phénoliques allant de molécules simples (acides phénoliques) à des molécules complexes (Tanins) (**Martin et Andriantsitohaina, 2002**).

Les polyphénols sont des métabolites secondaires présents chez toutes les plantes vasculaires (**Lebham, 2005**).

Près de 8000 composés naturels appartiennent à cette famille; ils ont en commun un noyau benzénique portant au moins un groupement hydroxyl. Selon le nombre d'unités phénoliques présents, on les classe en composés phénoliques simples et polyphénols. Par abus, on les appelle indifféremment composés phénoliques ou polyphénols et comprennent essentiellement les phénols simples, les acides phénoliques, les stilbènes, les flavonoïdes, les tanins hydrolysables et condensés, les coumarines, les lignanes, les lignines et les xanthones. (**Donatien K, 2008**).

Nous pouvons dire que les polyphénols sont des composés phénoliques hydrosolubles, de poids moléculaire compris entre 500 et 3000 Dalton, et ayant, outre les propriétés habituelles des phénols, la capacité de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et autres protéines (**Dangles et al., 1992 ; Hagerman et al., 1998 ; Sarni-Manchado et Cheynier, 2006**).

2.2. Rôle des polyphénols

Les polyphénols sont des molécules indirectement essentielles à la vie des plantes (d'où la dénomination de métabolites secondaires). Par opposition aux métabolites primaires qui alimentent les grandes voies du métabolisme basal, mais ils sont essentiels dans l'interaction de la plante avec son environnement. (**Zeghad, 2009**).

Le rôle des composés phénoliques est maintenant reconnu dans différents aspects de la vie de la plante et dans l'utilisation que fait l'homme des végétaux. Ils peuvent en effet intervenir :

- Dans certains aspects de la physiologie de la plante (lignification, régulation de la croissance, interaction moléculaires avec certains microorganismes symbiotiques ou parasites ...)
- Dans les interactions des plantes avec leur environnement biologiques et physiques (relation avec les bactéries, les champignons, les insectes, résistance au UV), soit directement dans la nature soit lors de la conservation après récolte de certains végétaux.
- Dans les critères de qualité (couleur, astringence, amertume, qualités nutritionnelles...) qui orientent les choix de l'homme dans sa consommation des organes végétaux (fruits, légumes, tubercules...) et des produits qui en dérivent par transformation.
- Dans les variations de certaines caractéristiques des végétaux lors du traitement technologiques (préparation des jus de fruits, des boissons, fermentées...) pendant lesquels apparaissent fréquemment des brunissements enzymatiques qui modifient la qualité du produits fini.
- Dans la protection de l'homme vis-à-vis de certaines maladies en raison de leur interaction possible avec nombreuses enzymes et de leurs propriétés antioxydants.
(Machiex *et al.*, 2005)

2.3. Classification :

Il existe différentes classes de polyphénols sont classés selon le nombre d'atome de carbone dans le squelette de base (**Laraoui, 2007**), les différents classes sont résumés dans la figure 02 (**Yvon Gervaise, 2004**).

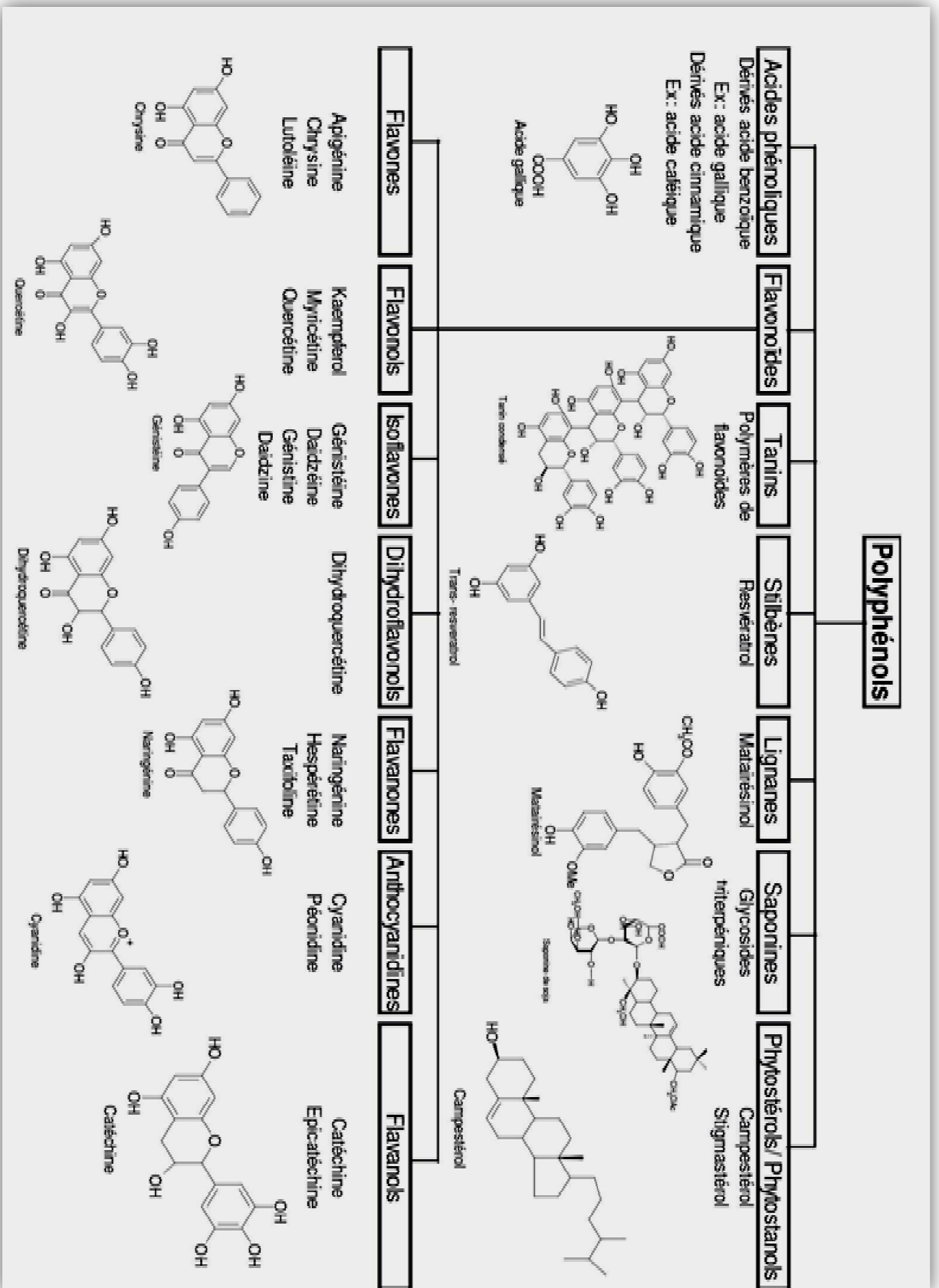


Figure 02 : Classification des polyphénols (Yvon Gervaise, 2004)

2.3.1. Acides phénoliques

Les acides phénoliques sont contenus dans un certains nombre de plantes agricoles et médicinales (**Psotová et al., 2003**). Ils ont une fonction acide et plusieurs fonctions phénols. Ils sont incolores et rares dans la nature. Ce sont les dérivés hydroxylés de l'acide benzoïque et de l'acide cinnamique.

- **Acides hydroxybenzoïques** : sont très communs aussi bien sous forme libre que combinée à l'état d'esters ou d'hétérosides. Ils sont formés d'un squelette à sept atomes de carbones qui incluse plusieurs molécules et les plus fréquentes sont : L'acide gallique, l'acide vanillique, l'acide syringique et le p-hydroxybenzoïque (**Nagendran, 2006**).
- **Acides hydroxycinnamiques** : ayant une structure de base en (C6-C3), rarement présents à l'état libre, ils existent le plus souvent sous forme estérifiée ou sous forme de glycoside. (**Sarni-Manchado et Cheynier, 2006**), Les composés les plus fréquents sont l'acide saticylique, l'acide caféïque, l'acide p-coumarique et l'acide sinaptique (**Newsletter, 2005**).

2.3.2. Les coumarines

Le squelette de base des coumarines est constitué de deux cycles accolés avec neuf atomes de carbone (**Ford et al., 2001**), ces composés sont dérivés de l'acide hydroxycinnamique par cyclisation de la chaîne latérale de celui-ci. A l'état naturel, ils se présentent à la fois sous forme hétérosidique et sous forme libre ; cette dernière constitue le principe actifs de certains plantes. Néanmoins, certaines formes complexes telles que les aflatoxines. (**Sarni-Manchado et Cheynier, 2006**)

2.3.3. Les flavonoïdes

Ce sont des composés phénoliques des végétaux constituent un groupe d'une extrême diversité. Plusieurs milliers de molécules ont été identifiées à ce jour (**Alan et Miller, 1996 ; Rajnerayanama et al., 2001**) . Ces flavonoïdes sont des pigments des végétaux largement distribués, jouent un rôle majeur dans la coloration des fleurs des fruits. (**Ghestem et al.,2001**).

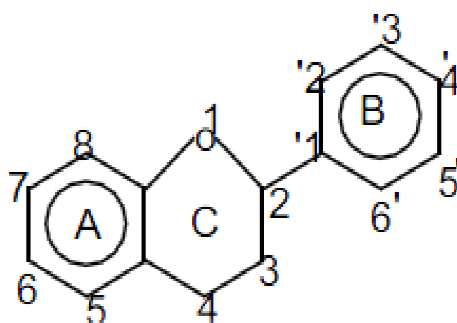


Figure 03: Structure nucléaire des flavonoïdes (Sarni-Manchado, Cheynier, 2006)

Ces molécules ont un poids moléculaire faible consiste à 15 atomes de carbones arrangés comme suit C6-C3-C6 sont composés de deux noyaux aromatiques A et B, liés par un pont de 3 carbones souvent sous forme d'un hétérocycle. (Nagendram, 2006)

Les substitutions variées au sein d'hétérocycle C donnent les différents sous classes des flavonoïdes :

- **Flavonols:** quercétine, myricétine, rutine, kaempférol...
- **Flavones :** apigénine, lutéoline...
- **Flavanones :** eriodictyol, naringine, naringénine...
- **Isoflavones :** génistéine, daidzéine...
- **Anthocyanidines :** alpha-tocophérol, malvidine, cyanidine, delphinidine, pélagonidine,... (Sarni-Manchado, Cheynier, 2006).

2.3.4. Les tanins

Le mot tanin fait référence à un large groupe de composés (poly) phénoliques naturellement produits par les plantes. Ces composés, solubles dans l'eau, se caractérisent par leur faculté à se combiner aux protéines et à d'autres polymères organiques tels que des glucides, des acides nucléiques, des stéroïdes et des alcaloïdes, pour former avec eux des complexes stables. Ce sont des molécules assez volumineuses avec un poids moléculaire généralement compris entre 500 et 3000 Da (Zhu et al., 1997 ; Makkar., 2003).

Du point de vue structural, les tanins constituent un groupe chimique hétérogène, avec des structures moléculaires variées. En général, ils sont subdivisés en deux groupes distincts en fonction du type de l'acide phénolique et du type de liaisons qui déterminent la taille et la réactivité chimique de la molécule (Khanbaba et Ree, 2001).

- ✓ **Les tanins hydrolysables :** Comme leur nom l'indique, ces substances s'hydrolysent facilement en milieux acides et alcalins ou sous l'action d'enzymes (telle que la tannase), pour donner des glucides et des acides phénoliques (**Leinmüller et al.,1991**).

- ✓ **Les tanins condensés :** sont appelés proanthocyanidines parce que leur oxydation en milieu alcool-acide entraîne la formation de pigments anthocyanidiques tels que les cyanidines (à partir de procyanidines) et les delphinidines (à partir de prodelphinidines). Les anthocyanidines sont responsables de la coloration variée des fleurs, des feuilles et des fruits en rose, rouge, mauve, violet et bleu. Leur présence dans les plantes est, de ce fait, détectable à l'œil nu (**Leinmüller et al., 1991 ; Hedqvist, 2004**).

2.4. Polyphénols de grenade

Parmi les substances végétales secondaires de la grenade, on trouve un taux très élevé de polyphénols glucoconjugués. Parmi les polyphénols de la grenade, on compte les acides carbo-phénoliques (acide ellagique, acide gallique, acide caféique, acide chlorogénique), les ellagitanines (comme la punicalagine) et des flavonoïdes (comme la catéchine, la quercétine, le camphre, la lutéoline et d'anthocyanes) (**Cerda et al., 2004 ; Cerda et al., 2005**).

Ces molécules sont dotées de plusieurs activités biologiques :

2.4.1. Activité neuroprotectrices

Il est récemment apparu que les polyphénols de grenade développent une activité antioxydante protectrice du système nerveux. Il a un potentiel prometteur dans le domaine de la prévention des attaques d'apoplexie, du Parkinson, de l'Alzheimer et de la sclérose (**Loren et al., 2005**)

2.4.2. Activité protectrice de l'estomac et du foie

Évidemment, d'autres organes peuvent aussi profiter de l'effet protecteur antioxydant des polyphénols de grenade : ainsi, on a constaté de forts effets protecteurs antioxydants sur la muqueuse de l'estomac contre les ravages de l'alcool et de l'acide acétylsalicylique (**Ajaikumar et al., 2005**) ainsi que sur le foie (**Kaur et al.2006**). Ces effets peuvent protéger

le foie contre les conséquences d'inflammations et de séquelles dues, entre autres, à l'alcool (par exemple : cancer et cirrhose).

2.4.3. Activité anti-inflammatoire

Les polyphénols de grenade permettent non seulement de lutter efficacement contre les radicaux libres par le renforcement des systèmes de protection du corps mais également d'inhiber le processus inflammatoire. L'effet anti-inflammatoire du jus de grenade s'explique notamment par leur action inhibitrice sur plusieurs facteurs responsables de l'inflammation. **(Khan et al., 2007 ; Syed et al., 2006).**

2.4.4. Activité préventive des maladies cardiovasculaires

Il a été démontré que les polyphénols de jus de grenade exercent des effets protecteurs importants au niveau cardiovasculaire :

- ✚ Diminution du risque d'infarctus **(Sumner, 2005).**
- ✚ Diminution des facteurs d'athérosclérose **(Aviram, 2004).**
- ✚ Diminution de la pression artérielle **(Aviram, 2004)**
- ✚ Diminution de l'oxydation du cholestérol LDL et total **(Aviram, 2004).**

2.4.5. Activité préventive d'arthrite

Des études pré-cliniques actuelles montrent que les polyphénols de grenade peuvent combattre la dégénérescence inflammatoire du tissu cartilagineux en particulier en cas d'arthrite rhumatoïde **(Salahuddin et al., 2005 ; Shukla et al., 2008).**

Dans le cas d'arthrite rhumatoïde, le tissu cartilagineux des articulations est endommagé et détruit par des processus inflammatoires. On a démontré que les polyphénols de jus de grenade lyophilisés inhibent la formation des protéines inflammatoires **(Salahuddin et al., 2005).**

Les polyphénols freinent la formation des métalloprotéases qui sont en grande partie co-responsables de la destruction du cartilage. Ces résultats pourraient signifier un gain de mobilité et de qualité de vie pour les patients atteints d'arthrite **(Salahuddin et al., 2005).**

2.4.6. Activité antidiabétique

Même si le jus de grenade est naturellement constitué d'une forte concentration de glucides (65 gr de fructose pour 135 gr de jus, valeur 100 ml, soit une densité de 1,35), il a, sur les diabétiques, un effet bénéfique vasoprotecteur et provoque une réduction du cholestérol. Dans la grenade, les molécules de sucre naturel sont liées en grande partie à des polyphénols antioxydants.

Rosenblat *et al.*, 2006 ont démontré que le jus de grenade ne provoque pas d'augmentation du taux de glycémie, du cholestérol, des lipides et des acides gras chez les diabétiques, mais a un effet tout à fait positif sur leurs taux dans le sang tout en diminuant nettement le stress oxydatif.

En outre, le métabolisme du cholestérol total semble être favorablement influencé. 22 diabétiques souffrant de troubles du métabolisme des lipides et d'hypercholestérolémie ont bu 30 ml de concentré de jus grenade par jour (**Esmailzadeh *et al.*, 2006**). Après 8 semaines on a constaté une diminution notable du cholestérol LDL et du cholestérol total. Les triglycérides et la fraction HDL n'ont pas été modifiés.

2.4.7. Activité anticancéreuse

Les cellules cancéreuses ont la capacité de redevenir des cellules saines par un processus appelé différenciation. Les flavonoïdes peuvent induire cette différenciation avec une toxicité plus faible que les rétinoïdes, ce qui les rend intéressant pour le traitement de la leucémie, mais aussi des cancers du sein ou de la prostate (**Kawaii, 2004**)

Ainsi, les fractions riches en polyphénols de grenade ont une activité anti-proliférative, anti-invasive, et pro-apoptose sur des cellules cancéreuses de sein et de prostate, les extraits de jus fermenté et de peau de grenade étant plus efficaces (**Kawaii, 2004**)

Seeram *et al.* ont par ailleurs montré que les différents antioxydants du jus de grenade agissent de manière synergique puisque le jus de grenade a une activité antioxydante plus élevée qu'un extrait de tanins de grenade totaux seul, que la punicalagine seule et que l'acide ellagique seul. Ainsi le jus de grenade a la plus forte activité antiproliférative sur des lignées cellulaires de cancer du colon (inhibition de 30 à 100%) (**Seeram, 2005**).

2.4.8. Activité cicatrisante

Comparé à un produit topique antibactérien du commerce, une préparation à base d'extrait de peau de grenade (44% de composés phénoliques) à 5% permet une bonne cicatrisation,

nettement visible par examen histopathologique des blessures des rats Wistar utilisés. Au bout de 10 jours, les rats traités au gel à l'extrait de peau de grenade sont guéris alors que 16 à 18 jours sont nécessaires à la cicatrisation des rats témoins. Les analyses par HPLC montrent que les composants majoritaires de l'extrait sont la catéchine et l'acide gallique, molécules qui pourraient donc avoir un intérêt dermatologique (Murphy, 2004).

3.9. Activité antivirale

Une étude récente (Haidiri et al., 2009) montre que les polyphénols de grenade ont non seulement un effet anti-inflammatoire mais qu'ils tuent même le virus de la grippe Influenza-A et inhibent sa multiplication ; ils renforcent l'efficacité d'un traitement à l'oseltamivir (Tamiflu®).

Les polyphénols de grenade ont aussi des effets antiviraux intéressants contre les virus HIV-1 (Neurath et al., 2004 et 2005).

3. Généralités sur *Staphylococcus aureus*

3.1. Historique

Les staphylocoques ont été découverts dans un pus par Pasteur en 1880. En 1883, Ogston a créé le nom de « Staphylocoque » pour décrire ces grains (kokkos) groupés en amas irréguliers à la façon d'une grappe de raisin (staphylos). En 1884, Rosenbach a obtenu des cultures pures de ces bactéries.

Il a scindé le genre *Staphylococcus* en deux groupes selon que les colonies étaient blanches ou dorées (Avril et al., 1992).

3.2. Caractéristiques générales

S. aureus est une bactérie Gram positive de 0,5 à 1,5 µm de diamètre, asporulée, non mobile, coagulase positive et elle est groupée en amas ou en paires (Hermier et al., 1992 ; Kosikowski et Mistry, 1997). C'est une bactérie aéro-anaérobie facultative et chimio-organotrophe qui a un métabolisme respiratoire et fermentatif (Kloos et Schleifer, 1986).

Les souches de *S. aureus* présentent des exigences nutritionnelles particulières. Elles ont besoin d'une source organique d'azote (5 à 12 acides aminés) et de vitamines. Des études ont montré que certaines souches de *S. aureus* ont besoin de différents acides aminés,

particulièrement la cystine, l'aspartate et le glutamate. L'arginine, la valine, la leucine, la glycine et la proline, sont eux aussi, importants pour les besoins nutritionnels de certaines souches. Néanmoins, les besoins en acides aminés varient selon les souches (**Taylor et Holland, 1989 ; Kuroda et al., 2001**).

3.3. Classification

D'après Euzeby en Bergey's manuel 2002 et NCBI (National Center for Biotechnology Information) taxonomie, la nouvelle classification des staphylocoques est la suivante :

- Règne : Bacteria.
- Domaine : *Eubacteria*.
- Division : *Firmicutes*.
- Classe : *Bacilli*.
- Ordre : *Bacillales*.
- Famille : *Staphylococaceae*.
- Genre : *Staphylococcus*.
- Espèce : *Staphylococcus aureus*

3.4. Habitat

La bactérie est très répandue chez l'homme et dans des nombreuses espèces animales. Chez l'homme, environ un tiers des sujets sont des porteurs sains qui hébergent la bactérie au niveau des muqueuses (principalement les fosses nasales) et des zones cutanées humides (périnée, aisselles) (**Nauciel et Vildé, 2005**)

3.5. Transmission

La transmission interhumaine s'opère généralement par contact direct (manuportage). Elle peut aussi être indirecte par les vêtements, la literie ou les aliments (**Nauciel, 2001**). On observe aussi également une diffusion par voie aérienne chez des patients porteurs des staphylocoques et atteints d'une pathologie rhino-sinusienne (**Davido, 2010**).

3.6. Caractères culturels

S. aureus croît abondamment sur milieu gélose (colonies de 1 à 2 mm de diamètre) ; certaines souches produisent un pigment jaune-orange mais cette production est irrégulière.

La culture est obtenue en 18 à 24 heures à 37 °C (culture possible de 10 à 45 °C) sur milieux ordinaires. *S.aureus* pousse en présence de fortes concentrations salines (milieu sélectif de Chapman à 7.5 % de NaCl). Le pH optimal est de 7,0 à 7,5.

Il existe des variants exigeants en facteurs de croissance : thiamine, acide panthoténique... (Avril *et al.*, 1992).

3.7. Facteurs de virulence

S.aureus a développé de nombreux facteurs de virulence lui permettant de résister aux systèmes de défenses (Assous *et al.*, 1999) (Tableau III) :

1. Constituants de la paroi : La paroi est constituée par des substances enzymatiques ou toxiques produits par *Staphylococcus aureus* qui sont des facteurs de virulence. Le peptidoglycane et les acides teichoïques induisent la production de cytokines impliquées dans le choc infectieux. La protéine A, liée au peptidoglycane fixe le fragment Fc des immunoglobulines G.

2. Enzymes : la coagulase libre est une exo-enzyme capable de coaguler le plasma oxalaté ou citraté. Elle entoure le corps bactérien de fibrine, ce qui les protège de la phagocytose. La coagulase liée aux corps bactériens fixe le fibrinogène et provoque son agglutination. Elle entraîne la formation d'embolies septiques.

3. Toxines : Parmi les nombreuses toxines produites par *S.aureus*, les staphylolysines qui ont un effet cytotoxique mis en évidence sur les hématies. La leucocidine est cytotoxique pour les granulocytes. Les toxines exfoliatrices, produites par certaines souches ont un tropisme cutané, elles provoquent un décollement intra-épidermique qui se manifeste par des lésions bulleuses.

Les entérotoxines se répartissent en sept types antigéniques, les entérotoxines A et B sont plus souvent responsables des toxi-infections alimentaires, elles sont préformées dans les aliments et thermostables.

La toxine du syndrome de choc toxique staphylococcique ou TSST-1 est un superantigène retrouvé chez plus de 90% des souches responsables de ce syndrome. (Fauchère *et Avril*, 2002)

Tableau III : Facteurs de virulence de *S.aureus* et leur rôle (Assous *et al.*, 1999)

Facteurs	Rôles
Leucocidine	Provoque des dommages au niveau des leucocytes.
Catalase	Diminue probablement l'action destructrice des phagocytes.
Hémolysines	Lyse les hématies ainsi que d'autre cellules.
β –lactamase	Inactivent les pénicillines
Exofoliatine	Provoque le décollement de la peau dans le syndrome de Lyell.
Enterotoxines	Responsables d'intoxication alimentaires.
Coagulase	Provoque la prise en masse du plasma.
Hyaluronidases	Destruction des substances de base du tissu conjonctif.

3.8. Pouvoir pathogène

Les infections à *S.aureus* sont très fréquentes et apparaissent sous des aspects cliniques très variés :

3.8.1. Les staphylococcies cutanés, sous cutanés et muqueuses

S.aureus peut être à l'origine d'infections cutanées superficielles ou profondes. L'infection superficielle se traduit par un impétigo, onyxis ou folliculite. L'infection profonde est représentée par des abcès intrafolliculaires de toute la graine du poil appelés furoncles, ou par des infections des canaux des glandes sudoripares appelées hidrosadénites. L'anthrax est un conglomérat de furoncles et la staphylococcie maligne de la face en est une localisation particulièrement grave.

On observe aussi des infections cutanées associées à la présence de cathéters ainsi que des psoriasis ou des eczémas surinfectés par *S.aureus*, mais sans signes cliniques d'infection (Avril *et al.*, 1992 ; Fauchere et Avril, 2002).

3.8.2. Localisations viscérales à *S.aureus*

Elles surviennent soit isolément, soit dans le cadre d'une septicémie patente:

- Staphylococcies osseuses : ostéomyélite aiguë
- Staphylococcies pleuropulmonaires : très fréquents chez les enfants, rare chez les adultes.

- Staphylococcies urogénitales : les pyélonéphrites à staphylocoques sont assez fréquentes.
- Staphylococcies neuroméningées : elles sont rares et dominées par les méningites observées surtout en milieu neuro-chirurgical.
- L'endocardite staphylococcique s'observe notamment chez les patients porteurs de valves cardiaques artificielles. (Avril *et al.*, 1992 ; Nauciel, 2005)

3.8.3. Septicémies à *S.aureus*

Les staphylococcémies sont causés et entretenues par un foyer infectieux primaire compliqué de thrombophlébite; ce sont des infections fréquentes d'une gravité préoccupante. L'évolution est émaillée de métastases septiques (Avril *et al.*, 1992 ; Pebret, 2003)

3.8.4. Toxi-infections

- a) **Alimentaires:** Elles sont dues à l'ingestion d'entérotoxines (A et B), préformées dans l'aliment, résistant aux sucs digestifs et pour certaines à la chaleur, entraînant des troubles d'apparition précoce (moins de 3h) avec vomissement, diarrhée, déshydratation et absence de fièvre. (Avril *et al.*, 1992)
- b) **Entérococolites aiguës :** Elles surviennent au décours d'une antibiothérapie et sont dues à la prolifération de *S.aureus* antibiorésistant et producteur d'entérotoxines (Avril *et al.*, 1992).
- c) **Syndrome de choc toxique TSS :** Il associe fièvre, hypotension, rash maculaire érythémateux suivi d'une desquamation scarlatiniforme et souvent de diarrhée. Les hémocultures sont stériles. Il est lié à l'action de la toxine staphylococcique, TSST-1 (Toxic shock Syndrome Toxin-1), ou, semble-t-il, de certains sérotypes d'entérotoxines (Avril *et al.*, 1992 ; Singleton, 2002)

3.9. Résistance aux antibiotiques

3.9.1. *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline ou MRSA

Dans le début des années 60, l'introduction de méticilline avait permis de résoudre un des problèmes thérapeutiques liés aux infections de souches de *S.aureus* productrice de pénicillinases et multirésistantes. Cependant dès le milieu des années 70, les premières

souches résistants à la méticilline et aux aminoglycosides sont décrites en Australie et très rapidement dans le monde entier (**Bryskier, 1999**).

3.9.2. Mécanisme de résistance à la méticilline

Le mécanisme de résistance à la méticilline a commencé à avoir un début d'explication quand la PLP2a a été mise en évidence en 1984. (**Bryskier,1999**)

La première cible des bêtalactamines est la PLP (protéine liant la pénicilline), la plupart des PLP sont une partie intégrante de la synthèse terminale de peptidoglycane. (**Bryskier,1999**)

Les souches de *S.aureus* résistantes à la méticilline ont acquis une PLP supplémentaire, appelée PLP2a ou PLP2' qui fixe les bêtalactamines mais avec une faible affinité ; les bêtalactamines inhibent l'activité des autres PLP, mais la présence de la PLP2a est suffisante pour permettre la synthèse d'une quantité suffisante de peptidoglycane modifié qui permet la survie bactérienne. La qualité de peptidoglycane produite est mauvaise, ce qui explique que les souches SARM ne survivent qu'en milieu hospitalier et sont à l'origine d'épidémies d'infection nosocomiales (**Bryskier, 1999**).

❖ Autre mécanisme de résistance à la méticilline

- Par diminution de la synthèse et/ou de l'affinité des PLP.
- Par hyper production de bêtalactamase.
- Par production de méticillinase.

Ce sont des mécanismes beaucoup plus rares occasionnant des résistances de moindre niveau (**Decoster, 2008**).

3.10. Traitement

Le choix de l'antibiothérapie sera guidé par l'antibiogramme et le contexte clinique. Les souches communautaires sont généralement résistantes aux pénicillines G et A, mais sensibles aux pénicillines M (et aux céphalosporines). Elles sont souvent sensibles aux macrolides, aux synergistine, aux fluoroquinolones (**Nauciel et Vildé, 2005**).

Selon les données du Réseau national de surveillance de la résistance aux (Antibiotiques (AARN) 2005-2006, *S aureus* résistantes à la méticilline :

- MRSA : 43.9% données retenues de 14 labo sur 24.
- *S.aureus* résistant à l'oxacilline dans un milieu hospitalier : 38,7% (2002) à 56,7% (2006).

A

AARN.2008. Algerian Antimicrobial Resistance Network, 9ème rapport de la surveillance des bactéries aux antibiotiques, Algerie, Santé Algerie, 2008. [www.sante.dz/aarn/index.htm].

Abdelly C. 2008. Phenolic composition of cynara cardunculus L. organs, and thier biological activities .C. R. Biologies. 331: 372-379.

Abi Azar, R. 2007. Complexation des proteines laitieres par les extraits de gousses vertes de caroubier : proprietes technologiques des coagulums obtenus. Thèse de doctorat de l'université de Paris, 154 : 50-51.

Ajaikumar K.B ., Aseef M ., Babu B.H et Padikkala J.2005. The inhibition of gastric mucosal injury by *Punica granatum L.* (Pomegrenate) methanolic extract. Journal of Ethnopharmacologie.69:171-176.

Alan L et Miller N.D. 1996. Antioxydant flavonoids: Structure, function and clinical usage. Alt Med Rev. 1(2): 103-111.

Askun T., Tumen G ., Satil F et Ates M. 2009. In vitro activity of methanol extracts of plants used as spices against Mycobacterium tuberculosis and other bacteria. Food chem.. 116:289-294.

Assous M.V et Anne L.B. 1999. Microbiologie et pathologie infectieuse. Edition Américaine. pp : 973.

Aviram M .2004. pomegrenate juice consumption for 3 years by patients with carotid artery stenosis reduces common carotid intima-media thickness, blood pressure and LDL oxidation. Clinical Nutrition. 23;423-433.

Avril J.L ., Dabernat H ., Denis F et Montiel H. 1992. Bacteriologie clinique, 2^{ème} édition. Ellipses. pp 9-20.

B

Bamforth C.W. 2000. Perceptions of beer foam. J. Inst. Brew.106: 229-38.

Baum N. 1988. Arbres et arbustes de l'Égypte ancienne. Peeters Publishers Numéro 81.pp 381 :149-152

Bellakhdar J.2006. Plantes médicinales au Maghreb et soins de base, précis de phytothérapie moderne. Le Fennec, Casablanca Maroc. pp.174-5.

Benzi F.1999. L'histoire des plantes en méditerranée : art et botanique. Edition Actes

Sud.175 : 80-81.

Bernard B. 2001. Plantes médicinales du monde: croyances et réalités. De Boeck Secundaire. pp 660 :944-943.

Bernard B. 2001. Plantes médicinales du monde: croyances et réalités. Estem. pp 635 : 437-438.

Bryskier A. 1999. Antibiotiques, agents antibactériens et antifongiques. Ellipses .1216.

C

Cerda B., Espin J.C., Parra S., Martinez P., Tomas-Barberan F. 2004 Jan. «The potent in vitro antioxidant ellagitannins from pomegranate juice are metabolised into bioavailable but poor antioxidants hydroxyl-6H- dibenzopyran-6-one derivatives by the colonic microflora of healthy humans.». Eur. J. Nutr, 2004 Aug. 43(4): 205-20.

Cerda B., Periago P., Espin J.C et Tomas-Barberan F. 2005 Jul. Identification of urolithin a as a metabolite produced by human colon microflora from ellagic acid and related compounds. J. Agric. Food Chem. 13 ; 53 (14): 5571-6.

Corne P.2004. *Staphylococcus aureus* dans un service de réanimation : étude génétique, phénotypique et épidémiologique.

Courchet L.D.J. 1897. Traité de botanique : comprenant l'anatomie et la physiologie végétales et les familles naturelles à l'usage des conditions au certificat d'étude physique, chimique et naturelles, des étudiants en médecine et en pharmacie. Baillière.pp1320 : 1019-1023.

Cowan M.M.1999. Clin. Microbiol. Rev. 12.564.

D

Dadi P.K., Ahmad M et Ahmad Z. 2009. Inhibition of ATPase activity of Escherichia coli ATP synthase by polyphenols. Int. J. Biol. Macromol.45(1):72-9.

Dangles O., Stoeckel C., Wigand M.C et Brouillard R. 1992. Two very distinct types of anthocyanin complexation: Copigmentation and inclusion. Tetrahedron Lett. 33:5227-30.

Daurel C, Leclercq R.2010. Vancomycin, what else ? . Elsevier Masson SAS 4:S121-8. microbiol Scand. B. Suppl.217-90.

Davido B.1998. Staphylococcus aureus infections. Diplôme d'état en médecine.339 : 520-32.

Debib A., Tir-touil A., Mothana R.A., Meddah B., Sonnet P. 2013. Phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of two fruit varieties of algerian ficus carica l, Journal

of Food Biochemistry, doi:10.1111/jfbc.12039

Delarras C. 2007. Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. Edition Tec & Doc. 476 pages (64-68-429-430-447-448). 2^{ème} édition Masson.162 pages (5-86-87).

Diallo D., Sango R., Yasambou H., traoré A., Coulibaly K et Maiza A. 2004. Etude des constituants des feuilles de *Zizyphus mauritiana* Lam. (Rhamnaceae), utilisées traditionnellement dans le traitement du diabète au Mali. Comptes rendus. Chimie, 7 :1073-1080.

Djelouat S. 1990. Le diagnostique biochimique bactérien. Alger. Édition sciences et techniques. P30-49.

Donatien K.2008. Enquête ethnobotanique de six plantes médicinales maliennes:-extraction.

E

Ericsson H.M.A et Sherris J.C. 1971. Antibiotic sensitivity testing. Report of an international collaborative study. Actapath M identification d'alcaloïdes – caractérisation – quantification de polyphénols : étude de leur activité antioxydante. Univercite Paul Varline de Metz-UPV-M. Diplome de doctorat.p31..

Esmailzadeh A ., Tahbaz F ., Gaieni I ., Alavi-madj H ., Azadbakht L. 2006. Cholesterol-lowering effect of concentrated pomegranate juice consumption in type II diabetic patients with hyperlipidemia.Int.J.Vitam.Nutr.Res.76:3 147-151.

Essawi T et Srour M. 2000. Screening of some palestinian medicinal plants for antibacterial activity. J. ethnopharm. 70: 343-349.

F

Falleh H ., Ksouri R ., Chaieb K ., Karray-Bouraoui N ., Trabelsi N ., Boulaaba M ., Murtaza N ., Mizra M ., Yaqeen Z et Badar Y. 1994. Studies on antibacterial activity of *Nelumbium speciosum* wild seed oil extracts. PJSIR. 37:269-272.

Farineau J ., Morot-Gaudry J.F .2011. La photosynthèse: Processus physiques, moléculaires et physiologiques.Quae.p 268

Fauchère J.L et Avril J.L. 2002. Bactériologie générale et médicale. Ellipses, France. pp : 365.

Fauchère J.L. 1997. Bactériofiches : techniques en bactériologie cliniques. Ellipses. pp : 33-78-84.

Ford R.A., Hawkins D.R., Mayo B.C et Api A.M. 2001. The in vitro dermal absorption and metabolism of coumarin by rats and by human volunteers under simulated conditions of use in fragrances. Food and Chemical toxicology, 39:153-162

G

Garnier G ., bézanger-Beauquesne L et Dabraux G. 1961. Ressources médicinales de la flore française. Vigot frères. pp.1511 :838-842.

Ghestem A ., Segum E ., Paris M ., Orecchioni A.M.2001. Le préparateur en pharmacie: Botanique – pharmacologie – phytothérapie – homeopathie. Lavoisier Tec et Doc. Paris.p273.

Gil M I ; Tomas-Barberan F A ; Hess-Pierce B ; Holcroft D M et Kader A A. 2000. Antioxydant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. Dans J Agric Food Chem. Vol 48, n°10.p. 4581-9.

Godet J.D. 1991. Arbres et arbustes aux quatre saisons. Les guides pratiques du naturaliste. Delachaux et Niestlé. pp.215 :96-170.

Guerin Fabulée V. 2010. Les mécanismes de résistance des bactéries aux antibiotiques. In : journées nationales des GTV, Lille, 26, 27,28 juillet 2010.93-102.

Guillemot D ., Laval A et Millemann Y. 2006. Usage vétérinaire des antibiotiques, résistance bactérienne et conséquence pour la sante humaine. [En ligne]. Agence française de sécurité sanitaire des aliments. [[http:// les rapports. La documentation francaise.fr /BRP/0740000](http://lesrapports.ladocumentationfrancaise.fr/BRP/0740000)].

H

Hagerman A.E., Riedl K.M ., Jones G.A ., Sovik K.N ., Ritchard N.T ., Hartzfeld P.W et Richel T.L. 1998. High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxydants. J. Agric. Food Chem. 46: 1881-92.

Hassan N.A ., El-Feky G.S. et Elegami H.M. 2013. Antibacterial Activity of Thirty Two Pomegranate (*Punica granatum* L.) Accessions Growing in Egypt Fruit Peels, World Applied Sciences Journal 21 (7): 960-967, 2013

Hedqvist H. 2004. Metabolism of soluble proteins by Rumen Microorganisms and influence of Condensed Tannins on Nitrogen Solubility and Degradation. Doctoral thesis Swedish University of Agricultural Sciences Uppsala (Sweden).

Hermier J ., Lenoir J et Weber F. 1992. Les groupes microbiens d'intérêt laitier. Cepil.

K

Kaur G ., Jabbar Z ., Athar M ., Alam M.S. 2006. Punica granatum (pomegranate) flower extract possesses potent antioxidant activity and abrogates Fe-NTA induced hepatotoxicity in mice. Food and Chemical Toxicology.17.

Kawaii S.2004. Differentiation-promotion activity of pomegranate (punica granatum) fruit extracts in HL-60 human promyelocytic leukaemia cells. J Med Food. Spring 7(1);3-18.

Khan N ., Hadi N ., Afaq F ., Syed D.N ., Kweon M.H ., Mukhtar H. 2007. Pomegranate fruit extract inhibits pro-survival pathways in human A549 lung carcinoma cells and tumor growth in athymic nude mice. Carcinogenesis. 28,1 :163-173.

Khanbaba K et Ree T.R. 2001. Tannins: classification and definition. Journal of Royal Society of Chemistry Kelawala NS, Antioxidant activity of selected foodstuffs. Int J Food Sci Nutr. 2004 Sep; 55(6): 511-6.

Kloos W.E et Schleifer K.H. 1986. Genus *Staphylococcus* in Bergey's Manual of Systemic Bacteriology. Eds Sneath P.H.A , Mair N.S , Sharpe M.E and Holt J.C. The Williams Wilkins Co. Baltimore .1013-1035.

L

Lebham. 2005. Thèse au laboratoire d'Ecophysiologie et Biotechnologie des Halophytes et des Algues au sein de l'institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM)- Université de Bretagne occidentale (UBO). Lavoisier. 2-10.

Leinmüller E ., Steingass H et Menke K.H. 1991. Tannins in ruminant feed stuff. Institute of Animal Nutrition, University of Hohenheim (Germany). Medecine. Edition Tylor & Francis: 244.

Leyral G ., Joffin J.N.1995. Microbiologie technique. 1er édition. Centre régional de documentation pédagogique d'aquitaine.

Loren D.J ., Seeram N.P ., Schulman R.N ., Holtzman D.M. 2005. Maternal dietary supplementation with pomegranate juice is neuroprotective in an animal model of neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Pediatric Research*. 57: 858-864.

Loziene K ., Venskutonis P.R ., Sipailiené A et Labokas J. 2007. Radical scavenging and antibacterial properties of the extracts from different *Thymus pulegioides* L. Chemotypes. *Food Chem*. 103: 546-559.

M

Macheix J.J ., Fleuriet A et Jay-Allemand C. 2005. Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Presses polytechnologiques et universitaires romandes. pp 19-20.

Makkar H.P.S. 2003. Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannins-rich feeds. *Small Ruminant Research*.49 : 241-256.

Marjorie M.C. 1999. Plant products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 564-582.

Martin S et Andriantsitohaina R. 2002. Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie*. 51 :304-315.

Milane H. 2004. La quercétine et ses dérivés : molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres ; études et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat. Strasbourg.

Murat Ku C ., Sevgi K ., Sengul K ., Esra U ., Cemalettin B et Ferda C. 2007. Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. *Food chemistry*. 100:526-534

Murphy K.N. 2004. Study on wound healing activity of punic granatum peel. *J Med Food*. Summer.7(2): 256-9.

N

- Nagendran B., Kalyana S et Samir S. 2006.** Phenolic compounds in plants and agriindustrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food chemistry*. 99: 191-203.
- Natarajan D ., John Britto S ., Srinivasan K ., Nagamurugan N ., Mohanasundari C et Perumal G. 2005.** Antibacterial activity of *Euphorbia fusiformis*-A rare medicinal herb. *J Ethnopharmacol*. 102: 123-126.
- Nauciel C et Vildé J L.2005.** *Bactériologie médicale*, 2^{ème} édition. Elsevier masson.. pp 257.
- Nauciel C. (2005).** ABREGES connaissances et pratique « Bactériologie médicale ». 2ème édition. MASSON, Paris. 83-85.
- Nauciel C. 2001.** *Bactériologie médicale*. Edition Masson. 275 pages (83-85-87).
- NCCLS, 2005.** National Committee for clinical laboratory standards for antimicrobial disk susceptibility tests: Approved standards. NCCLS, Wayne, Pennsylvania, USA.
- Newsletter. 2005.** Elément actifs du mois, par l'équipe parabolic biologicals. Naghma khan, Naghma Hadi, Farrukh Afaq, Deeba N. Syed, Mee-Hyang Kweon, and jung K.H 2006.«Suppressive effect of *Punica granatum* on the production of tumor necrosis factor (Tnf) in BV2 microglial cells.» *Biological and pharmaceutical bulletin*. N°8.29: 1258-1261.
- Nostro A ., Germano M.P ., D'Angelo V ., Marino A et Cannatelli M.A. 2000.** Extraction methods and bioantography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Lettres en microbiologie appliquée*.30(5): 379.

O

- OMS.2005.** La résistance aux antimicrobiens : une menace pour la sécurité sanitaire mondiale.58/14 : 1-5.

P

- Panichayupakaranant P ., Tewtrakul S. et Yuenyongsawad S. 2010.** Antibacterial, anti-inflammatory and anti-allergic activities of standardized pomegranate rind extract. *Food Chemistry*. *Food Chemistry* (123) 400–403

Pannaux G. 2012. Résistance aux céphalosporines dans la flore commensale digestive des ruminants. Ecole nationale vétérinaire d'Alfort. Diplôme de doctorat vétérinaire.

Pebret F. 2003. Maladies infectieuses: toutes les pathologies des programmes officiels des études médicales et paramédicales. Heures de France .196.

Planchon G et Collin E.1875. Traité pratique de la détermination des drogues simples d'origine végétales. Librairie F. savy. Tome 1. pp.235-236-307-308.

Psotová J., Lasovsky J et Vicar J. 2003. Metal chelating properties, electrochemical behavior, scavenging and cytoprotective activities of six natural phenolic. Biomed. pp 174-153.

R

Rahman M et Gul S. 2002. Antibacterial Activity of Hydrodistilled Essentiel oil for Psammogeton canesens N.O. Umbelliferae Biotechnology.1(1) : 55-60.

Rajnerayanama K ; Reddy M ; Charluvadi M R et Krishna D R. 2001. Bioflavonoids: Classification, pharmacological, biochemical effect and therapeutic potential. Indian Jornal of Pharmacology. 33: 2-16.

Rojas A ., Hernandez L ., Pereda-Miranda R et Mata R. 1992. Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexain medicinal plants. J. Ethnopharmacology.35: 275-283.

S

Sabine R.D. 1995. Antibiotiques et antibiogramme. pp 322.

Sağdaç O. 2003. Sensitivity of flore pathogenic bacteria to Turkish thyme and oregano hydrosols. Lebensm-wiss. U.-Technol. 36: 467-473.

Sagdic O et Ozcan M. 2003. Antibacterial activity of turkish spice hydrosols. Food Control. 14: 141-143.

Salahuddin A ., Naizhen W ., Bilal B.H ., Vinay K ., Cheruvu ., Tariq M.H.2005. punica granatum L.extract inhib-its IL-1 beta-induced expression of matrix metalloprotenases by inhibiting the activation of MAP kinases and NF-kappaB in human chondrocytes in vitro. Jornal of Nutrition. 135:2096-2102.

Sarni-Manchado P et Cheynier V. 2006. Les polyphénols en agroalimentaire. Lavoisier (Tec & Doc), Paris. 300-398.

Seeram N.P ., Henning S.M ., Zhang Y ., Suchard M ., Li Z et Heber D. 2006. Le jus de grenade métabolites sont présents dans ellagitannin plasma humain et certains persistent dans l'urine pendant jusau'à 48 heures. Journal de nutrition. 136 (10) : 2481-2485.

Shahidi F., Naczk M. 2001. Extraction of condensed tannins from beach pea (*Lathyrus maritimus* L) as affected by different solvents. Food Chemistry, **75**:509-512.

Shan B ., Cai Y.Z ., Brooks J.D ., Corke H. 2007. The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. International J Food Microbiology. 117: 112-119.

Shukla M ., Gupta K ., Rasheed Z ., Khan K.A haqqi T.M. May.2008. Consumption of Hydrolyzable tannins-rich pomegrenate extract supresses inflamation and joint damage in rheumatoid arthritis.Jornal of Nutrition.2008 may 17, Onligne-Publikation vor druck.

Singleton P.2002. Bacteriologie.4e edition, Paris dunod.331-351.

Spichiger R.E ., Savolainen V ., Figeat M et Jeanmonod D.2004. Botanique systématique des plantes à fleurs : une approche phylogénique nouvelle, des angiospermes des régions tempérées et tropicales. Presses polytechniques et universitaires romandes. Troisième édition. pp.413.

Summer M.D .2005. Effects of pomegranate fruit extract juice consumption on myocardial perfusion in patients with coronary heart desease. Am.J.Cardiol, 96,6:810-814.

Syed D.N ., Malik A ., Hadi N ., Sarfaraz S ., Afaq F ., Mukhtar H. 2006. Photochemopreventive effect of pomegranate fruit extract on UVA-mediated activation of cellular pathways in normal human epidermal keratinocytes. Photochem.photobiol.82,2: 398-405.

T

Turkmen N ., Velioglu Y.bbS ., Sarni F et Polat G.2007. Effect of Extraction Conitions on Measured Total Polyphenol Contents and Antioxidant and Antibacterial Activities of Black Tea. Molecules. 12: 484-496.

U

Ulanowska K ., Tranczyk A ., Konopa G et Wegrzym G. 2006. Differential antibacterial activity of genistien arising from global inhibition of DND, RNA and protein synthesis in some bacterial strains. *Biological Research*. 33(2): 55-64.

UNESCO, 1960. Recherches sur la zone aride : les plantes médicinales des régions arides. La science et la culture, place de fontenoy, Paris-7^e imprimeries Oberthur, Rennes.pp.81-82.

USDA, NRCS. 2002. U.S. Department of Agriculture, Nutrition Research Service Center The Plants Database, USA.

V

Verbios S. 18 juin 2009. La médecine indienne: fondement et pratiques de l’Ayurveda. Eyrolles.pp.415 :354-355.

W

Wald E.2009. Le grenadier (*punica granatum*): plante historique et évolutions thérapeutiques récentes. UNIVERCITE HENRI POINCARE-NANCY 1, Diplôme d’Etat de docteur en pharmacie.158 : 22-41.

Wright G.D et Sutherland A.D.2007. New strategies for combating multidrug-resistant bacteria. *Trends MolMed*.13 (6): 260-7.

Y

Yvon Gervaise M. 2004. Analyse des antioxydants naturels dans les matières premières et les produits, 2 bis rue Duguay-Trouin BP 1282 - 76178 Rouen, Euroforum, Paris – le 12 octobre 2004.

Z

Zeghad N. 2009. Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d’intérêt économique (*Thymus vulgaris* , *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne. UNIVERSITE MENTOURI COSTANTINE, Diplôme de magister (Ecole doctorale). pp 11.

Zhu M ; Phillipson J D ; Greengrass P M ; Bowery N E et Cai Y. 1997. Plant polyphenols: biologically active compounds or non-selective binders to protein. *Phytochem.*44: 441-447.

www.sgs-multilab.com

<http://plants.usda.gov>.

Annexe 01

Matériel non biologique

1) Appareillage et verrerie :

- Blouse de laboratoire.
- 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
- Portoir
- Poire
- Boite de pétri
- Ecouillons stériles
- Anse de platine
- Pincettes métalliques
- Bec bensen
- Lames et lamelles
- Pipettes pasteurs stériles
- Microscope optique
- Agitateur
- Barmanitique
- Etuve à 45 °C
- Réfrigérateur à 4°C
- Densitomètre.
- Etuve à 37°C
- Entonnoir
- Bicher
- Ballon
- Papier filtre

- Spatule
- Rotavapeur
- Centrifuge
- Papier aluminium
- Balance.
- Papiers whatmann de 9mm.
- Bain-marie.

2) Réactifs, solutions et solvants :

- Eau physiologique stérile à 0.9%
- Eau distillée stérile
- Eau de javel
- Eau oxygénée
- Alcool à 95%
- Huile à immersion
- Antiseptique
- Réactifs de GRIESS NR1 et NR2.
- Poudre de Zinc.
- Acétone.
- Éther de pétrole
- violet de gentiane
- Lugol.
- La fuschine

3) Milieux de culture, milieux d'identification:

- Gélose nutritive.
- Gélose Chapman.
- Gélose Muller-Hinton.
- Gélose Mueller-Hinton additionnée de 4% de NaCl.
- Milieu mannitol-mobilité.
- Bouillon nitraté.

Annexe 02:

Résultats de l'identification de *S.aureus*



Figure A : Test de catalase



Figure B : Test par Mannitol mobilité



Figure C : Recherche de la coagulase libre

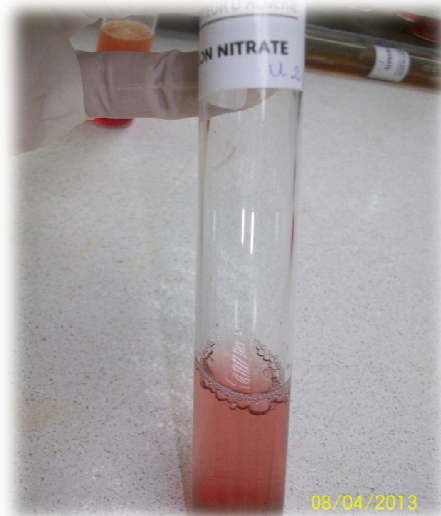


Figure D : Recherche de nitrate réductase

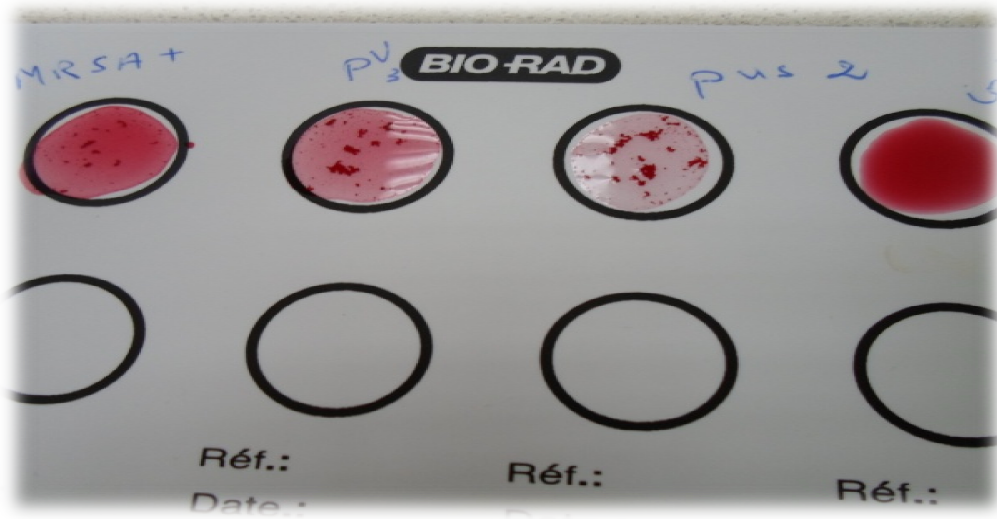
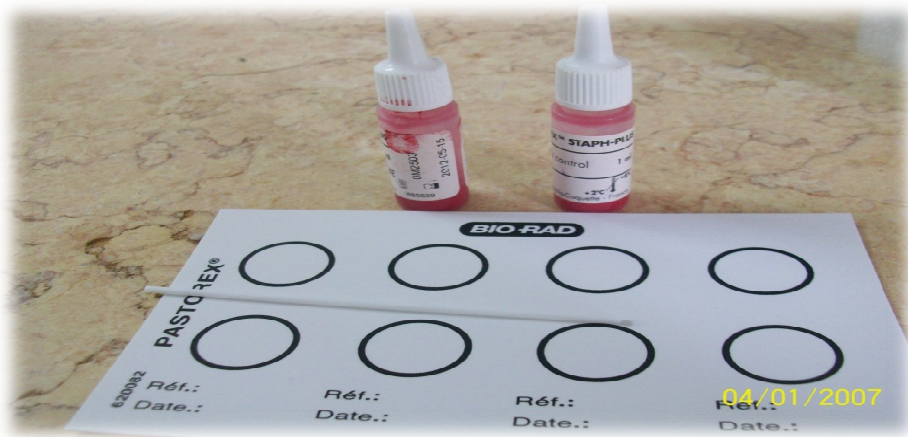



Figure E : Test de recherche de la coagulase par les anticorps monoclonaux Pastorex Staph-plus.


Annexe 03

Composition des principaux 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 Chapman :


Composition	Figure
-Extrait de viande de bœuf.....1g -Chlorure de sodium.....75g -Peptone.....10g -Mannitol.....10g -Rouge de phénol.....0.025g -Gélose.....15g pH=7.4	

Composition de principaux milieux d'identification utilisés par litre d'eau distillée.

◦ Milieu Mannitol-mobilité :

Composition	Figure
-hydrolysate tryptique de caséine:.....10,0 g mannitol:.....7,5 g rouge de phénol:.....0,4 mg nitrate de potassium:.....1,0 g agar:.....3,5 g pH = 7,6	

◦ Bouillon nitraté :

Composition	Figure
-Infusion cœur-cerveau..... 25,0 g - Nitrate de sodium..... 10,0 g pH = 7,2	

Annexe 04

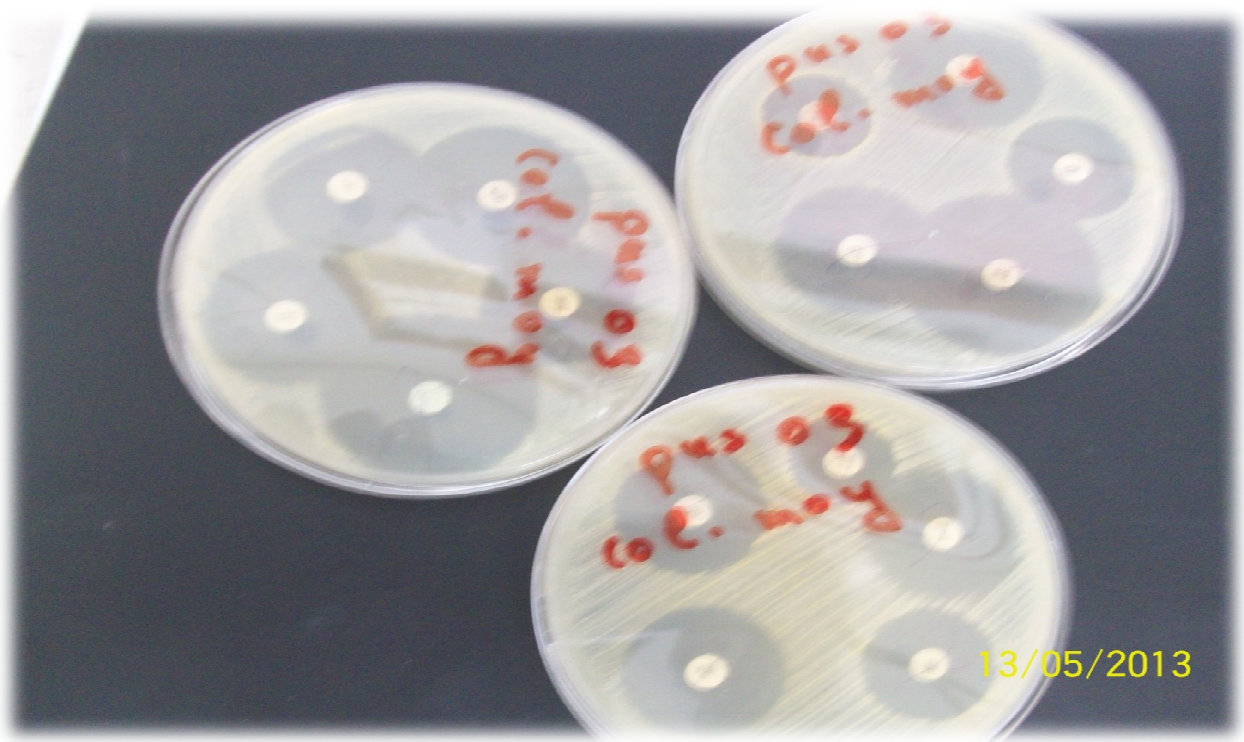


Figure F: Quelques résultats de l'antibiogramme

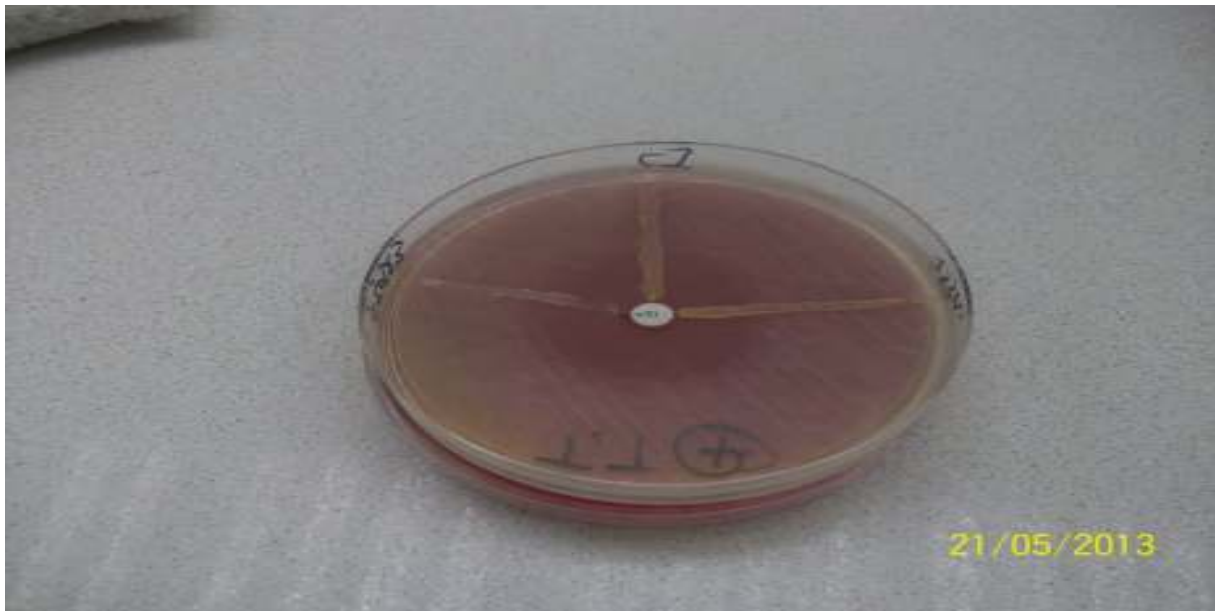


Figure G : Résultats de test de trèfle

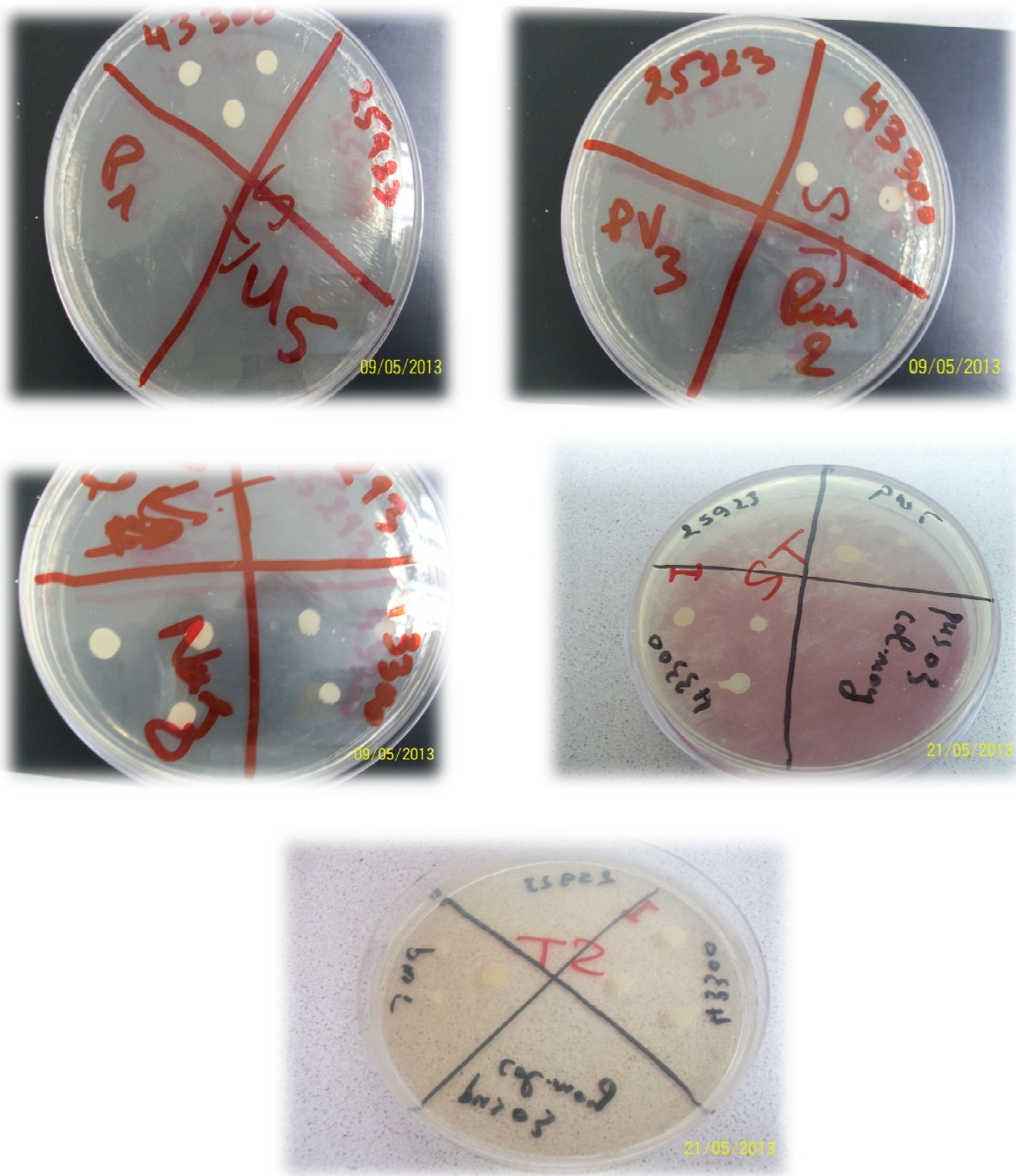


Figure H : Résultats de screening test

Annexe 05

Tableau VII : Liste des antibiotiques (ordre alphabétique des noms)

Antibiotiques (nom commun)	Sigle	Classe
Acide fucidique	FA	stérol
Céfoxitine	FOX	céphalosporine 2er gén
Chloramphénicol	C	phénicolés
Clindamycine	DA	macrolides
Erythromycine	E	macrolides
Gentamicine	GN	aminosides
Kanamycine	K	aminosides
Oflaxacine	OFX	quinolones 2ème gén
Oxacilline	OX	pénicilline M
Pénicilline G	P	pénicilline G
Pristamycine	PT	macrolides-streptogramines
Rifampicine	RA	divers
Tétracycline	TE	Tétracyclines
Triméthoprime +sulfaméthox	SXT	sulfamides
Vancomycine	VA	Glycopeptides

Tableau VIII : Concentrations et diamètres critiques pour *Staphylococcus* sppTable de lecture 4 : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour *Staphylococcus* spp.

Antibiotiques testés	Charge des disques	Diamètres critiques (mm)			CMI critiques (µg/ml)			Commentaires
		R	I	S	R	I	S	
Penicilline	10 UI	28	---	29	0,25	-----	0,12	Le test de la β-lactamase confirme les cas douteux (voir « Tests complémentaires ».) Interprétation valable pour toutes les pénicillines inactivées par les β-lactamases (ampicilline, ticarcilline, piperacilline...)
Oxacilline (<i>S.aureus</i>)	1 µg	10	11 – 12	13	4	----	2	Tester le disque de céfoxitine 30 µg pour détecter la résistance à la méticilline de <i>S.aureus</i> et des staphylocoques à coagulase négative. En cas de résultat intermédiaire ou de discordance entre les disques d'oxacilline et de céfoxitine, se référer au chapitre « Tests complémentaires ». La résistance à la céfoxitine (et à l'oxacilline) signifie la résistance à toute la famille des β-lactamines.
Oxacilline (<i>S.lugdunensis</i>)	1 µg	---	----	----	4	-----	2	
Céfoxitine (<i>S.aureus</i> et <i>S.lugdunensis</i>)	30 µg	21	---	22	8	----	4	
Oxacilline (S.C.N. sauf <i>S.lugdunensis</i>)	1 µg	---	---	----	0,5	----	0,25	
Céfoxitine (S.C.N. sauf <i>S.lugdunensis</i>)	30 µg	24	---	25	---	----	---	
Gentamicine	10 µg	12	13 – 14	15	16	8	4	Les souches résistantes à la gentamicine sont résistantes à tous les autres aminosides sauf à la streptomycine.**
Kanamycine	30 µg	13	14 – 17	18	64	32	16	Pour <i>S.aureus</i> , les souches résistantes à la Kanamycine doivent être interprétées « R » à l'amikacine quelque soit le diamètre autour de l'amikacine**.
Amikacine	30 µg	14	15 – 16	17	64	32	16	
Erythromycine	15 µg	13	14 – 22	23	8	1-4	0,5	Détecter la résistance inducible en plaçant le disque d'érythromycine à côté du disque de clindamycine. En présence d'une image d'antagonisme, répondre « Résistance à érythromycine et clindamycine »
Clindamycine	2µg	14	15 – 20	21	4	1-2	0,5	

Tableau IX : Concentrations et diamètres critiques pour *Staphylococcus* sppTable de lecture 24 : Valeurs critiques de la cefoxitine pour la détection des souches de souches de *Staphylococcus* spp. et *S.aureus* mélicillino résistantes² (En médecine vétérinaire).

Antibiotiques testés	Organismes	Diamètres critiques (mm)		Commentaires
		R	S	
Cefoxitine (30µg)	<i>S.aureus</i> and <i>S.augmentinus</i>	≤21	≥22	- Si le diamètre de la zone d'inhibition est ≤ 21 mm, la souche de <i>S.aureus</i> est résistante à l'oxacilline - Si le diamètre de la zone d'inhibition est ≥22 mm, la souche de <i>S.aureus</i> est sensible à l'oxacilline
	<i>S.C.N</i> and <i>S.augmentinus</i>	≤24	≥25	- Si le diamètre de la zone d'inhibition est ≤ 24 mm, la souche de <i>S.C.N</i> est résistante à l'oxacilline - Si le diamètre de la zone d'inhibition est ≥25 mm, la souche de <i>S.C.N</i> est sensible à l'oxacilline

Tableau X: Concentrations et diamètres critiques pour *Staphylococcus* spp

Table de lecture 31 : Valeurs limites des diamètres des zones d'inhibition pour les souches de référence utilisées pour le contrôle de qualité (En médecine vétérinaire)

Antibiotiques testés	Charge de disque	<i>E.coli</i> ATCC 25922	<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27953	<i>S.aureus</i> ATCC 25923	<i>S.pneumoniae</i> ATCC 49619	<i>H. influenzae</i> ATCC 49247
Pénicilline	10 UI	-	-	28-37	24-30	-
Pénicilline-Novobiocine	(100I/30 µg)	-	-	30-36	24-30	-
Ampicilline	10 µg	16-22	-	-	30-36	13-21
Amoxicilline-Acide clavulanique	23/10 µg	18-24	-	30-36	-	15-23
Oxacilline	1 µg	-	+	18-26	-	+
Céfalexine	30µg	15-21	-	-	-	-
Céfotaxime	30µg	-	-	-	31-38	-
Céftriaxone	30µg	-	-	20-28	+	-
Céfepime	30µg	26-31	14-16	-	-	-
Kanamycine	30µg	17-21	-	18-26	-	-
Gentamicine	10µg	19-26	16-21	18-27	-	-
Sulfazoxazole	300 µg	15-23	+	24-36	+	-
Tamoxoprine-Sulfaméthoxazole	1,25/23,75 µg	23-29	-	24-32	-	24-32
Fébrégiline	30µg	18-25	-	24-30	27-31	14-22
Acide Nalidixique	30µg	24-29	-	-	-	-
Erofloxacine	5µg	32-40	15-19	27-31	-	-
Muribofloxacine	5µg	29-37	-	-	-	-
Colistine	10µg	15-17	15-17	-	-	-
Nitrofurantone	10µg	20-25	-	-	-	-
Erythromycine	15µg	-	-	22-3	25-30	-
Chloramphénicol ¹	30µg	21-27	-	-	25-27	-
Vancomycine	30µg	-	-	17-21	20-27	-
Clindamycine	2µg	-	-	26-30	19-25	-
Tétracycline	15 µg	-	-	-	-	-

Annexe 06

Tableau XI : Rendement des extraits

	Extrait	Rendement en %
Jus	Ethérique	12.76
	Acétonique	13.52
	Aqueux	5.8
Pépin	Ethérique	26.71
	Acétonique	19.42
	Aqueux	12.33
Peau	Ethérique	4.2
	Acétonique	54.56
	Aqueux	33.52

Tableau XII : Diamètre des zones d'inhibition vis-à-vis les extraits testés (en mm)

	Peau			Pépin			jus		
	Acét	Aq	EP	Acét	Aq	EP	Acét	Aq	EP
U5	29	28.5	9	12.5	9	9	17.5	15	9
N1	18	20	9	9	9	9	10	9	9
Pus1	26	23	9	129	9	9	20	13	12
Pus2	20	15	9	9	9	9	13	10.25	12.5
Pus3	23	18	9	9	9	9	10.5	9	11
Pus4	23	18	9	9	9	9	14	11	11.5
Pus5	24	20	9	9	9	9	13.5	9	11
Pus6	25	23.5	9	9	9	9	12	11	12.5
Pv2	21	16	9	9	9	9	16.5	11.5	9.5
Pv3	21	22	9	9	10	9	13	12	9

Glossaire

Arthrite rhumatoïde : une inflammation de plusieurs articulations à la fois, qui enflent, deviennent douloureuses et sont limitées dans leur amplitude de mouvement.

Athérosclérose : est une association variable de remaniements de l'intima des artères de gros et moyen calibre consistant en une accumulation locale de lipides, de glucides complexes, de sang et de produits sanguins, de tissu fibreux et de dépôt calcaires ; le tout s'accompagnant de modifications de la media.

Endocardite : inflammation de l'endocarde, d'origine infectieuse ou rhumatismale.

Entérocolites : inflammation simultanée des muqueuses l'intestin grêle et du colon.

Furoncle : infection aiguë des follicules pileux sébacés. Un furoncle est une folliculite due à une infection par un staphylocoque doré.

Impétigo : infections bactériennes et contagieuses de la peau, fréquente chez l'enfant, caractérisées par des pustules puis croûtes épaisses, couleur miel.

Ostéomyélite : inflammation de l'os et la moelle osseuse.

Panaris : infection aiguë des doigts de la main ou plus rarement d'un orteil.

Pelletiérine : Alcaloïde vermifuge contenu dans la racine et la peau de grenadier

Pétiole : la pièce végétale qui relie le limbe de la feuille à la tige, partie rétrécie de la feuille, qui lui sert de support.

Rétinoïdes sont des dérivés de la vitamine A.

Syndrome de Lyell : Est une maladie de peau (dermatose) grave, qui débute brutalement par l'apparition sur l'ensemble du corps, de plaques de coloration rouge (placards érythémateux), et sur lesquelles apparaissent très rapidement, des bulles suivies d'un décollement de l'ensemble de l'épiderme (partie superficielle de la peau) et du derme (partie moyenne).

Thrombophlébite : inflammation d'une veine associée à une thrombose.