

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة محمد الصديق بن يحيى- جيجل

Université Mouhamed Seddik Ben yahia - Jijel

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département de Microbiologie Appliquée et
des Sciences Alimentaires



قسم الميكروبيولوجيا التطبيقية و علوم التغذية

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme : **Master Académique en Biologie**

Option : Microorganisme et Pathogénéité

Thème

**Etude de l'activité antibactérienne de l'extrait
méthanolique du fruit de Zaarour rouge
(*Crataegus monogyna*) vis-à-vis des bactéries résistantes
aux antibiotiques**

Membres de jury :

Président : D^r Sifour M.

Examinatrice : M^{me} Bekka F.

Encadreur : D^r Laggoune S.

Présenté par :

Alioua Roqya

Bouamoucha Imane

Année universitaire 2015-2016

N°d'ordre :.....

Sommaire

Remerciements

Dédicaces

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des Tableaux

Introduction..... 1

Partie Bibliographique

Chapitre I : Données générales sur *Crataegus monogyna*

L1. Définition.....	3
L2. Description botanique.....	3
L3. Exigences climatique.....	3
L4. Taxonomie.....	3
L5. Chimie de la plante.....	3
L5.1. Composition en métabolites primaires.....	3
L5.2. Composition en métabolites secondaires.....	4
L5.2.1. Acides phénoliques.....	4
L5.2.2. Flavonoïdes.....	5
L5.2.3. Tanins.....	5
L5.2.4. Anthocyane.....	5

Chapitre II : La résistance bactérienne aux antibiotiques

II.1. Généralités sur les antibiotiques.....	6
II.1.1. Définition.....	6
II.1.2. Origine d'antibiotiques.....	6
II.1.3. Critères de Classification des antibiotiques.....	6
II.1.4. Principales familles des antibiotiques et leur Mode d'action.....	6
II.1.4.1. Antibiotiques agissant sur la synthèse du peptidoglycane.....	6
II.1.4.2. Antibiotiques agissant sur la membrane.....	7
II.1.4.3. Antibiotiques inhibant la synthèse protéique.....	7
II.1.4.4. Antibiotiques agissant sur la biosynthèse des acides nucléiques.....	7
II.2. Les mécanismes de résistance aux antibiotiques.....	7
II.2.1. Définition.....	7
II.2.2. Le support génétique de résistance.....	7
II.2.2.1. La résistance naturelle.....	7
II.2.2.2. La résistance acquise.....	8
II.2.2.3. Mécanismes de résistance.....	8

Chapitre III : Notions sur les bactéries résistantes

III.1. Bactéries à Gram positif.....	10
III.1.1. <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline.....	10
III.1.2. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	10
III.1.3. Les entérocoques.....	10
III.2. Bactéries à Gram négatif.....	10
III.2.1. Entérobactéries productrices de BLSE.....	10
III.2.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10
III.2.3. <i>Acinetobacter baumannii</i>	10
III.3. Les souches étudiées.....	10

III.3.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	10
III.3.1.1. Habitat.....	10
III.3.1.2. Caractères morphologiques.....	11
III.3.1.3. Caractères culturels et biochimique.....	11
III.3.1.4. Pouvoir pathogène.....	11
III.3.2. Les Entérobactéries.....	11
III.3.2.1. <i>Escherichia coli</i>	11
III.3.2.2. <i>Klebsella pneumoniae</i>	11
III.3.2.3. <i>Enterobacter gergoviae</i>	12
III.3.2.4. <i>Proteus mirabilis</i> et <i>P. vulgaris</i>	12
III.3.2.5. <i>Citrobacter koseri</i>	12

Partie expérimentale

Chapitre IV : Matériels et Méthodes

IV.1. Matériels.....	13
IV.1.1. matériel végétal.....	13
IV.1.2. matériel bactériologique.....	13
IV.1.3. Milieux de culture.....	13
IV.2. Méthodes.....	13
IV.2.1. Extraction.....	13
IV.2.1.1 Le dépulpage.....	13
IV.2.1.2. Procédés d'extraction.....	13
IV.2.2. Identification des souches bactériennes.....	14
IV.2.2.1. Coloration de gram.....	14
IV.2.2.2. Tests biochimiques.....	14
IV.2.3. Antibiogramme de vérification de souches testées sur milieu solide...	16
IV.2.3.1. Définition de l'antibiogramme.....	16
IV.2.3.2. Réalisation.....	16
IV.2.4. Détermination de la CMI.....	18
IV.2.4.1. Définition.....	18
IV.2.4.2. Réalisation.....	18

Chapitre V : Résultats et discussion

V.1. Résultats.....	19
V.1.1. Extraction.....	19
V.1.2. Identification des souches.....	19
V.1.3. Activité antibactérienne.....	21
V.1.3.1. Antibiogramme des souches testées sur milieu solide.....	22
V.1.3.2. Aromatogramme sur milieu solide.....	25
V.1.4. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrices.....	27
V.2. Discussion.....	28
Conclusion	30
Glossaire	
Références bibliographiques	

Remerciement

Nous remercions ALLAH le tout puissant de nous avoir donné le courage et la volonté d'achever ce travail.

*Nous tenons particulièrement à remercier notre promotrice **D^r Laggoune Souheila**, pour avoir accepté la charge d'être rapporteur de ce mémoire, comme nous la remercions pour sa disponibilité, ses pertinents conseils et pour les efforts qu'elle a consenti durant la réalisation de ce mémoire. Ce travail témoigne de sa confiance et de son soutien dans tous les moments. Qu'elle trouve ici l'expression de notre reconnaissance et respect.*

Nous remercions également l'ensemble des membres de jury d'avoir accepté d'examiner et de juger ce modeste travail à savoir le

D^r Sifour M et M^{me} Bekka F.

Merci à tous les enseignants qui nous ont suivis tout au long de notre formation.

Un grand merci à tous ceux qui ont rendu l'ambiance si agréable au sein de notre promotion nous les avons remercié pour les excellents moments passés ensemble.

Merci

À ceux et celles qui nous ont aidé d'une façon ou d'une autre, de près ou de loin dans notre travail, nous les remercions du fond du cœur.

Merci à tous... ..

Dédicaces

Je dédie ce travail :

*A mon père Mr Alioua Massoud et ma mère
Hadda pour leur amour inestimable, leur
confiance, leur soutien, leurs sacrifices et toutes
les valeurs qu'ils ont su m'inculquer.*

A mes frère Sofiane, Mohamed, Ismail et Yousef.

*A mes sœurs Karima, Safia, Fouzia et Noura,
qui m'ont soutenue tout au long de ce travail
par leurs précieux encouragements.*

*A mon binôme Bouamoucha Imene par son aide
très précieuse que je ne remercierai jamais
assez.*

*A toute ma famille, à tous ceux qui ont
contribué de près ou de loin à finaliser ce
travail.*

Je vous dis merci.

Roqiya

Dédicaces

Je dédie ce travail :

A mes chers parents ma mère Nassima et mon père Mouhamed

Seddik

Pour leur patience, leur amour, leur soutien

et leurs encouragements.

*A mon frère Haroun et ma sœur Chahla, en témoignage de la
fraternité, avec mes souhaits de bonheur de santé et de succès*

Et à tous les membres de ma famille

*A mes amies, mes collègues et à tout qui compulse ce modeste
travail.*

Imane

Liste des abréviations

Abréviation	Désignation
AML25	Amoxicilline
ATCC	American Type Culture Collection
BLSE	β -lactamases à Spectre Etendue
CA-SFM	Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
CT50	Colistine Sulfate
P5	Penicilline G
PBP	Penicillin Binding Proteins
CMS	Colisméthate Sodique
LPS	Lypopolisacharidique
<i>bla</i>	beta-lactamase
PLP	Protéine de Liaison aux Pénicillines
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> Résistant à la Méricilline
SCCmec	Cassette Chromosomique Staphylococcique
ERV	Entérocoques Résistants à la Vancomycine
ERG	Entérocoques Résistants aux Glycopeptides
AmpC	Céphalosporinase
<i>gyrA</i>	Gyrase de type A
BMR	Bactéries Multi Résistantes
VP	Voges Proskauer

RM	Rouge de Méthylène
ONPG	Ortho-nitrophényl-B-galactoside
LDC	Lysine Décarboxylase
ODC	Ornithine Décarboxylase
ADH	Arginine Décarboxylase
CHU	Centre Hospitalo-universitaire

Liste des figures

N° de la figure	Titre de la figure	N° de la page
Figure I.1	Fruit et feuilles de <i>Crataegus monogyna</i>	3
Figure I.2	La structure chimique des acides phénoliques présents dans <i>Crataegus monogyna</i>	4
Figure I.3	La structure chimique des flavonols présents dans <i>Crataegus monogyna</i>	5
Figure I.4	La structure chimique de tanin présent dans <i>Crataegus monogyna</i>	5
Figure I.5	La structure chimique des anthocyanes présents dans <i>Crataegus monogyna</i>	5
Figure II.1	La structure chimique de la Pénicilline G et l'amoxicilline	6
Figure V.1	Antibiogramme des souches de références	24
Figure V.2	Antibiogramme des souches testées	24
Figure V.3	Aromatogramme des souches de références	26
Figure V.4	Aromatogramme des souches testées	26

Liste des tableaux

N° du tableau	Titre du tableau	N° de la page
Tableau I.1	Composition chimique de fruit de <i>Crataegus monogyna</i> .	4
Tableau IV.1	Les dilutions de la solution mère	17
Tableau V.1	Résultats de coloration de Gram des souches étudiées	19
Tableau V.2	Résultats de type respiratoire	20
Tableau V.3	Résultats du métabolisme glucidique	20
Tableau V.4	Résultats du métabolite protéique	21
Tableau V.5	Résultats de l'antibiogramme	23
Tableau V.6	Résultats d'aromatogramme	25
Tableau V.7	Résultats de la concentration minimale inhibitrice	27

Les plantes médicinales sont à la fois un produit fini destiné à la consommation et une matière première pour l'obtention de substances actives. Elles représentent une source de revenu non négligeable pour de nombreuses populations (**Bouزيد *et al.*, 2011**).

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

La phytothérapie, qui propose sur des remèdes naturels et bien acceptés par l'organisme, est souvent associée aux traitements classiques. Elle connaît de nos jours un renouveau exceptionnel, spécialement dans le traitement des maladies chroniques, comme l'asthme ou l'arthrite. De plus, les effets secondaires induits par les médicaments inquiètent les utilisateurs, qui se tournent vers des soins moins agressifs pour l'organisme (**Iserin *et al.*, 2001**).

Actuellement, les effets pharmacologiques des plantes sont de plus en plus étudiés et publiés. Ainsi, de nombreuses recherches scientifiques permettent de conforter l'usage traditionnel des plantes médicinales, et parfois de trouver de nouvelles indications thérapeutiques. Les études analytiques apportent aussi une meilleure connaissance sur la composition chimique et les mécanismes d'action de la plante et/ou ses composés (**Dessouroux *et al.*, 2011**).

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 multi-résistantes constituant 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 (**Chebaïbi *et al.*, 2011**).

La résistance des bactéries aux antibiotiques reste aujourd'hui un problème majeur de santé publique. La situation apparaît particulièrement préoccupante en milieu hospitalier. La pression de sélection exercée par l'utilisation importante de l'antibiothérapie et la diffusion épidémique des souches résistantes sont les deux facteurs principaux conditionnant cette évolution (**Soussy, 2007**).

Le recours aux ressources naturelles en général et aux plantes médicinales en particulier devient alors une des plus importantes et intéressantes pistes à explorer pour la recherche de nouveaux produits antibactériens plus efficaces (**Chebaïbi *et al.*, 2011**).

L'aubépine monogyne (*Crataegus monogyna*) est un fruit très apprécié par la population algérienne et notamment les enfants. C'est une plante médicinale couramment utilisée en phytothérapie pour ses propriétés sédative, vasculo-protectrice et anti-oxydante (**Bouزيد *et al.*, 2011**). Elle est utilisée pour soigner les palpitations, les douleurs cardiaques, l'angine de poitrine, les spasmes vasculaires, la tachycardie et autres arythmies, et l'hypertension. Elle s'utilise aussi pour traiter les bouffées congestives, les insomnies et autres désagréments de la ménopause, l'athérosclérose, les troubles de dystonies neurovégétatives (angoisses, vertiges, bourdonnement d'oreille), mais aussi les diarrhées, la dysenterie, et la lithiase urinaire et biliaire (**Iserin *et al.*, 2001**).

L'objectif de notre étude consiste à évaluer l'effet antibactérien de fruit du *Crataegus monogyna*.

Pour cela nous nous sommes fixés les objectifs suivants :

- Extraction de l'extrait méthanolique.
- Identification des souches bactériennes.
- Antibiogramme de vérification des souches testées sur milieu solide.
- Détermination des CMI.

Notre travail sera reparti en deux parties, initié par une revue bibliographique où nous apportons des données générales sur l'espèce étudié, des généralités sur les antibiotiques et la résistance bactérienne et en fin des généralités sur les bactéries résistantes.

La seconde partie rapportera les méthodes analytiques utilisées et les résultats obtenus ainsi que leur discussion.

I.1. Définition

Crataegus monogyna était déjà connue par les anciens qui, établissant son nom sur « krataios », faisaient référence à la dureté de son bois (Arnal-Schnebelen et Goetz., 2007), et *monogyna* souligne la particularité de sa fleur à n'avoir qu'un seul pistil (Aymonin, 1993 ; Mazzocchi *et al.*, 1999). C'est un membre endémique de la famille des *Rosacées* qui se développe en Europe, en Afrique et en Asie (Nabavi *et al.*, 2015).

I.2. Description botanique

Crataegus monogyna est un arbuste appartenant à la famille des *Rosacées*. Elle couvre toute l'Europe en dehors des zones alpines hautes et de la Scandinavie septentrionale. Elle peut atteindre une hauteur de 3 à 4 mètres, est couverte de nombreuses épines courtes.

Ses fleurs sont blanches ou rosées, avec 5 pétales libres groupés en bouquets, donnent naissance à des fruits rouges comestibles.

Les feuilles sont d'un vert brillant, ont cinq à sept lobes aigus plus profonds et écartés. Le pseudo-fruit de *C. monogyna* est obové (6-10 x 4-8 mm). Brun-rouge à rouge sombre, il est couronné par les restes des sépales réfléchis. Il renferme une seule graine, lisse et luisante. (Arnal-Schnebelen et Goetz., 2007) (Figure I.1).



Figure I.1. Fruit et feuilles de *Crataegus monogyna* (Iserin *et al.*, 2001)

I.3. Exigences climatiques

Il s'accommode à tous les terrains avec une intensité lumineuse élevée et le sol exposé. (Ferrazzini *et al.*, 2008), calcaires et se satisfait des plus secs. Elle peut se développer dans les sols acides, neutres et même alcalins (Aymonin, 1993).

I.4. Taxonomie (Messaili, 1995)

La classification botanique est la suivante :

- **Embranchement :** Spermaphytes
- **Classe :** Dicotylédones
- **Sous classe :** Dialypétales
- **Ordre :** Rosales
- **Famille :** *Rosacées*
- **Genre :** *Crataegus*
- **Espèce :** *Crataegus monogyna* Jacq

I.5. Chimie de la plante

I.5.1. Composition en métabolites primaires

Les Constituants chimiques de la partie comestible du *Crataegus monogyna* sont représentés dans le tableau (I.1), La teneur est en (g/100g de matière sèche).

Tableau I.1. Composition chimique de fruit de *Crataegus monogyna*.

Fraction		Teneur	Références
Protéines		2.5	(Herrara, 1984).
Lipides		2.3	
Elément minéraux	K	1.25	
	Ca	0.44	
	Mn	0.33	
	Mg	0.06	
	P	0.05	
Glucides	Glucose	13.893 ± 0.021	(Gundogdu <i>et al.</i> , 2014).
	fructose	18.378 ± 0.202	
	saccharose	0.970 ± 0.005	
Vitamine	Vitamine C	4.301 ± 0.121	

I.5.2. Composition en métabolites secondaires

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires caractérisés par la présence d'un cycle aromatique portant des groupements hydroxyles libres ou engagés avec un glucide (Boizot et Charpentier., 2006).

D'autres polyphénols incolores tels que des flavonols et flavanones interagissent avec des anthocyanes pour altérer la couleur des fleurs et fruits (Lalouette *et al.*, 1998).

I.5.2.1. Acides phénoliques

Les acides phénoliques sont divisés en plusieurs classes, parmi eux les hydroxybenzoïque et les acides hydroxycinnamiques (Mraïhi *et al.*, 2015) (Figure I.2).

	R1	R2	R3
acide hydroxybenzoïque et ses dérivées	OH	H	H
acide procatechui que	OH	H	H
acide vanillique	H ₃	H	H
acide hydroxycinnamique	H	H	H
acide p-cou marique	OH	C ₆ H ₄ O ₂	H
acide chlorogenique	OH	C ₆ H ₄ O ₂	H

Figure I.2. La structure chimique des acides phénoliques présents dans *Crataegus monogyna* (Mraïhi *et al.*, 2015).

I.5.2.2. Flavonoïdes

I.5.2.2. Flavonoïdes

La famille des flavonoïdes est divisée en six classes principales qui sont les flavonols, les flavones, flavanes-3-ols, les isoflavones, flavanones et anthocyanidine (Nacz et Shahidi, 2004; De Rijke *et al.*, 2006). Le flavonoïde majeur aglycone trouvé dans les aliments végétaux sont quercétine, myricétine et kaempférol. Dans les tissus végétaux, des flavonols et des flavones sont trouvés, conjugués à des sucres tels que le glucose, le galactose, le rhamnose, et rutinoside (Mraïhi *et al.*, 2015). Dans la partie charnue de *Crataegus monogyna* ont été décelés les flavonols représentée dans la figure I.3.

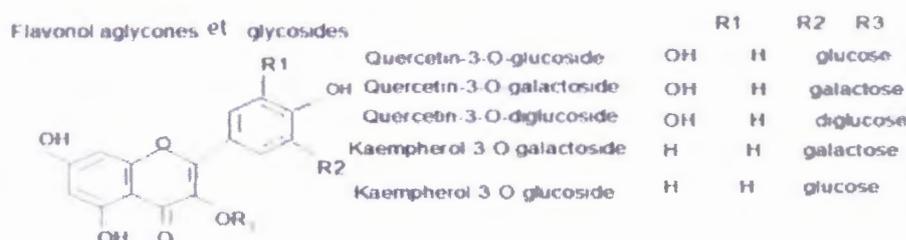


Figure I.3. La structure chimique des flavonols présents dans *Crataegus monogyna* (Mraïhi *et al.*, 2015).

a. Flavones

L'apigénine-7-O-glucoside et lutéoline-7-O-rutinoside sont les seules flavones trouvés dans le fruit de *Crataegus monogyna* (Mraïhi *et al.*, 2015).

I.5.2.3. Tanins

Les tanins sont des substances anti-nutritionnelles qui sont impliquées dans les mécanismes de défense, ils protègent la plante contre les attaques de microorganismes pathogènes et des prédateurs herbivores (Mebirouk-boudechiche *et al.*, 2014) (Figure I.4).

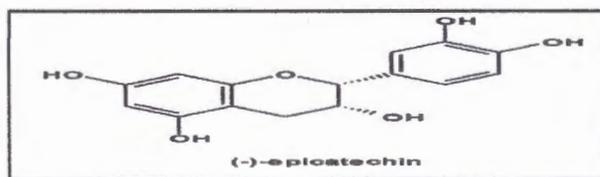


Figure I.4. La structure chimique de tanin présent dans *Crataegus monogyna* (Mraïhi *et al.*, 2015).

I.5.2.4. Anthocyanes

Les anthocyanes sont des puissants antioxydants. Les formes anthocyanes présents dans les aliments sont des glycosides et glycosides acylés de six des anthocyanes d'aglycone communs: pélagonidine, cyanidine, delphinidine, péonidine, petunidine et malvidol. (Mraïhi *et al.*, 2015) (Figure I.5).

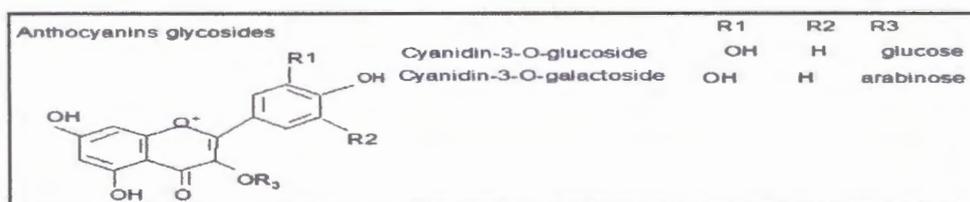


Figure I.5. La structure chimique des anthocyanes présents dans *Crataegus monogyna* (Mraïhi *et al.*, 2015).

II.1. Généralités sur les antibiotiques

II.1.1. Définition

Les antibiotiques sont des substances élaborées par des micro-organismes, ou des substances synthétiques, qui sont bactériostatiques ou bactéricides à dose faible. Leurs cibles d'activité sont des structures moléculaires spécifiquement bactériennes (Fauchère et Avril., 2002).

II.1.2. Origine d'antibiotiques

Les antibiotiques proviennent de trois sources majeures : les moisissures ou champignons, les bactéries, où la synthèse partielle ou totale (Fauchère et Avril., 2002).

II.1.3. Critères de classification

Elle peut se faire selon l'origine: élaboré par un organisme ou produit par synthèse, selon le mode d'action: paroi, membrane cytoplasmique, synthèse des protéines, synthèse des acides nucléiques ; ou le spectre d'activité et selon la nature chimique: elle est basée souvent sur une structure de base sur laquelle il y a hémi synthèse (Fauchère et Avril., 2002).

II.1.4. Principales familles des antibiotiques et leur Mode d'action

II.1.4.1. Antibiotiques agissant sur la synthèse du peptidoglycane

Le peptidoglycane est un polymère réticulé fait de chaînes polysaccharidiques reliées par des peptides (Nauciel et Vildé., 2005).

a. β -lactamines

Elles se fixent sur la transpeptidase. Il existe des variétés de β -lactamines qui se distinguent par leur spectre d'activité : Pénicillines (Pénicilline G, Pénicillines M, Pénicilline A), Céphalosporines (Duval et Soussy., 1990). La pénicilline G est active sur les cocci, les bacilles à Gram positif, et inactive sur bacilles à Gram négatif, tant que la Pénicilline A a un spectre d'activité élargi vers certains bacilles à Gram négatif, dans ce groupe on peut citer l'ampicilline et l'amoxicilline (Nauciel et Vildé., 2005) (Figure II.1).

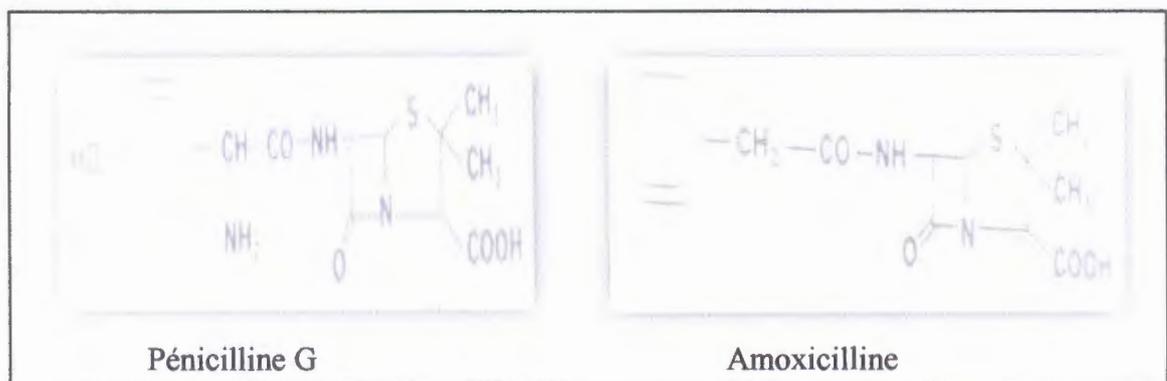


Figure II.1. La structure chimique de la Pénicilline G et l'amoxicilline (Duval et Soussy., 1990).

b. Les polypeptides

Inhibant la synthèse du peptidoglycane donc de la croissance bactérienne (Yala et al., 2001).

II.1.4.2. Antibiotiques agissant sur la membrane

a. Les polymyxines et les Nitrofuranes

Elles se fixent sur les membranes bactériennes (Nauciel et Vildé., 2005). Dont La colistine (ou polymyxine E) qui a une action létale sur les membranes bactériennes par interaction avec protéines et phospholipides membranaires. De ce mécanisme d'action découle un spectre d'activité qui couvre les bactéries à Gram négatif potentiellement multirésistantes (Kipnis et Guery., 2010).

II.1.4.3. Antibiotiques inhibant la synthèse protéique

a. Antibiotique se fixant sur la sous-unité 30S du ribosome

- ❖ **Les aminosides** : Se fixent sur la fraction 30S du ribosome, ils perturbent la synthèse des protéines entraînant la destruction bactérienne. Ils sont bactéricides (Yala *et al.*, 2001).
- ❖ **Les Tétracyclines** : Empêchent la fixation des aminoacyl-ARNt sur le site A des ribosomes (Nauciel et Vildé., 2005).

b. Antibiotique se fixant sur la sous unit 50S du ribosome

- ❖ **Chloramphénicol et les Macrolides** : Sont des inhibiteurs de la péptidyl-transférase qui permet l'élongation de la chaîne peptidique (Duval et Soussy., 1990).

II.1.4.4. Antibiotiques agissant sur la biosynthèse des acides nucléiques

- ❖ **Les sulfamides et triméthoprimes** : Sont des inhibiteurs enzymatiques de la biosynthèse de l'acide tétra-hydrofolique, précurseur des bases puriques et pyrimidiques (Fauchère et Avril., 2002).
- ❖ **Les quinolones, novobiocine et métronidazole** : Inhibent la réplication de l'ADN, leur action se situant à différentes étapes de la synthèse de cet acide nucléique (Fauchère et Avril., 2002).
- ❖ **Les rifamycines** : Par inhibition de l'ARN polymérase, empêchent la biosynthèse des ARN messagers (Fauchère et Avril., 2002).

II.2. Les mécanismes de résistance aux antibiotiques

II.2.1. Définition

Une souche est dite résistance lorsqu'elle supporte une concentration d'antibiotique plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des autres souches de la même espèce (Vaubourdolle, 2007).

II.2.2. Le support génétique de résistance

II.2.2.1. La résistance naturelle

Elle est permanente et d'origine chromosomique. Elle est stable, transmise à la descendance lors de la division cellulaire, mais elle n'est pas transférable d'une bactérie à l'autre (Yamashita *et al.*, 2000).

II.2.2.2. La résistance acquise

La résistance acquise résulte d'une modification de patrimoine génétique (Nauciel et Vildé, 2005). Elle apparaît avec l'emploi des antibiotiques chez un nombre d'espèces bactériennes initialement sensible (Vaubourdolle, 2007).

a. La résistance par mutation chromosomique

Elle résulte de la mutation chromosomique spontanée. Les gènes de résistance se situent alors dans le chromosome de la bactérie (Yamashita *et al.*, 2000).

b. La résistance extra chromosomique

Elle est liée à l'introduction dans la bactérie d'un élément génétique non chromosomique soit un plasmide ou transposon codant en général pour des protéines (Vaubourdolle, 2007). La résistance peut être acquise via l'échange génétique entre les bactéries voire, la transformation, la conjugaison ou la transduction (Tenover, 2006).

II.2.2.3. Mécanismes de résistance

a. Inhibition enzymatique

1. Production de β -lactamases

Les β -lactamases inactivent les β -lactamines en détruisant le lien amide sur le cycle lactame. Les gènes *bla*, pouvant être soit chromosomiques, soit plasmidiques, soit transférables, portés par des transposons (Vaubourdolle, 2007).

2. Production des pénicillinases

Les pénicillinases chromosomiques sont spécifiques d'espèces et confèrent à la bactérie une résistance naturelle. Les pénicillinases plasmidiques confèrent à la bactérie une résistance acquise (Vaubourdolle, 2007).

3. Les céphalosporinases

Ce sont des β -lactamases chromosomiques produites naturellement par un certain nombre d'espèces : *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter sp* (Vaubourdolle, 2007).

4. Enzymes inactivant les aminosides

On connaît 3 classes d'enzymes pouvant inactiver les aminosides : les acétyl-transférase, les nucléotidyltransférase et les phosphotransférase. Les gènes qui codent ces enzymes sont le plus souvent des plasmides (Nauciel et Vildé, 2005).

5. Enzymes inactivant le chloromphénicol

Le chloromphénicol peut être inactivé par un chloromphénicol acétyltransférase, codé par un gène plasmidique (Nauciel et Vildé, 2005). L'acyltransférase inactive l'antibiotique, le rendant incapable de se fixer sur sa cible (Vaubourdolle, 2007).

b. Altération des sites de liaison

1. Altération des protéines de liaison aux pénicillines (PLP)

Ce phénomène réduit l'affinité de la cible (PLP) pour les β -lactamines soit par une mutation des gènes chromosomiques, soit par l'acquisition de gènes supplémentaires exprimant de nouvelles PLP (Pitout *et al.*, 2004 ; Yamashita *et al.*, 2000).

2. Altération des sites de liaison ribosomiaux

L'altération intracellulaire de la sous-unité ribosomale ciblée dans la bactérie peut atténuer les effets antibactériens des macrolides, des aminosides ou du chloramphénicol. Cette altération cause une inhabilité d'inhibition de la synthèse protéique et de la croissance bactérienne pour les antibiotiques qui ne peuvent plus se lier au site ribosomal (Pitout *et al.*, 2004 ; Yamashita *et al.*, 2000).

3. Modification du précurseur du peptidoglycane

Le remplacement de la D-Ala terminale par un groupement lactate sur le précurseur du peptidoglycane entraîne une résistance aux glycopeptides chez les entérocoques (Nauciel et Vildé., 2005).

4. Altération de l'ADN-gyrase et de la topoisomérase

L'ADN gyrase est une enzyme nécessaire à l'activité des quinolones. Des mutations spontanées d'un seul acide aminé de l'ADN gyrase engendrent de la résistance. Il en est de même pour les mutations de la topoisomérase IV (Pitout *et al.*, 2004 ; Yamashita *et al.*, 2000).

5. Altération des enzymes cibles

Une modification de la dihydroptéroate synthétase résistant à la liaison avec les sulfamidés et de la dihydroptéroate réductase entraîne également une résistance (Pitout *et al.*, 2004 ; Yamashita *et al.*, 2000).

c. Réduction de la perméabilité cellulaire

Elle se produit par diminution de l'entrée de l'antibiotique sur son site, provoquée par une modification de la perméabilité de la membrane interne ou externe de la bactérie. Une altération des porines dans la paroi des bactéries à Gram négatif peut réduire ou bloquer la pénétration de l'antibiotique jusqu'à son site d'action (Pitout *et al.*, 2004 ; Yamashita *et al.*, 2000).

d. Pompes à efflux

L'antibiotique ne peut atteindre son site d'action par pompage actif de l'antibiotique à l'extérieur de la bactérie. Les transporteurs d'efflux de plusieurs médicaments sont des composants normaux des cellules bactériennes et contribuent pour une large part à la résistance intrinsèque des bactéries à de nombreux agents antibactériens. Ces pompes ont besoin d'énergie. L'exposition aux antibiotiques favorise une surexpression par mutation de transporteurs, entraînant une hausse de la résistance bactérienne (Pitout *et al.*, 2004 ; Yamashita *et al.*, 2000).

III.1. Bactéries à Gram positif

III.1.1. *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline

La résistance de *S. aureus* à la méticilline est liée à l'acquisition d'un gène codant pour une protéine nommée Penicillin Binding Protein 2a (PBP2a), qui n'est pas bloquée par la méticilline. Elle est codée par le gène *mecA* qui est localisé sur la cassette chromosomique staphylococcique (SCCmec) (Kouatchet et Eveillard, 2012).

III.1.2. *Streptococcus pneumoniae*

La résistance de *S. pneumoniae* aux β -lactamines et aux macrolides est due à une modification de leurs cibles naturelles (ADN gyrase, topo-isomérase IV) et/ou à une augmentation de l'efflux actif (Soussy, 2003).

III.1.3. Les entérocoques

Ces entérocoques résistants à la vancomycine ERV, ou ERG pour glycopeptides ayant des gènes permettent de synthétiser des précurseurs modifiés du peptidoglycane, entraînant une diminution de leur affinité. Le gène *vanA* est le plus fréquent et confère aux souches une résistance de haut niveau à la vancomycine (Lucet *et al.*, 2008).

III.2. Bactéries à Gram négatif

III.2.1. Entérobactéries productrices de BLSE

Les entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre élargi, apparues dans les années 1980 (Nicolas, 2012), les β -lactamases à spectre étendu sont des enzymes qui hydrolysent l'ensemble des pénicillines et les céphalosporines (Doit *et al.*, 2010). Elles sont induites soit par des plasmides, soit par la mutation du génome naturel. Les deux mécanismes confèrent aux bactéries touchées la capacité d'hydrolyser une grande variété de pénicillines et de céphalosporines (Vora et Auckenthaler, 2009).

III.2.2. *Pseudomonas aeruginosa*

Le développement de la résistance aux β -lactamines chez *P. aeruginosa* a été associé à la production de β -lactamases acquises, la surproduction constitutive de la céphalosporinase, ou l'efflux ou l'imperméabilité de la membrane externe (Cavallo *et al.*, 2002). Chez *P. aeruginosa*, la résistance de haut niveau fluoroquinolones est principalement liée à des mutations au niveau de *gyrA* (Mérens et Servonnet, 2010).

III.2.3. *Acinetobacter baumannii*

La diversité des mécanismes de résistance développés par cette espèce est impressionnante : enzymes d'inactivation, pompes à efflux, imperméabilité, modification de cibles. L'apparition concomitante de la résistance aux fluoroquinolones et aux aminosides a donné à cette bactérie le statut de bactérie multi-résistante ou BMR (Decré, 2012).

III.3. Les souches étudiées

III.3.1. *Staphylococcus aureus*

III.3.1.1. Habitat

Il s'agit de germes très répandus dans la nature (Avril *et al.*, 1992). C'est un commensal de la peau et des muqueuses de l'homme et des animaux (Schaechter *et al.*, 1999).

III.3.1.2. Caractères morphologiques

Cocci à Gram positif, isolés ou groupés en diplocoques en courtes chaînettes ou en amas ayant la forme de grappes de raisin, de 0,8 à 1µm de diamètre (Schaechter *et al.*, 1999). Ils sont immobiles, asporulés, parfois capsulés (Avril *et al.*, 1992).

III.3.1.3. Caractère cultureux et biochimiques

S. aureus cultive facilement sur les milieux usuels (Schaechter *et al.*, 1999). Elle pousse en présence de fortes concentrations salines (Avril *et al.*, 1992). C'est un germe aérobic-anaérobic facultatif, Il est catalase positive, capable de fermenter le glucose. Il est capable de fermenter le mannitol (Schaechter *et al.*, 1999).

III.3.1.4. Pouvoir pathogène

Elle peut provoquer des septicémies, toxi-infections alimentaires, staphylococcies-cutanées, sous-cutanées et muqueuses (Avril *et al.*, 1992).

III.3.2. Les Entérobactéries

Les *Enterobacteriaceae* sont des bacilles à Gram négatif, mobiles par une ciliature péritriche ou immobiles. Se développant en aéro-anaérobiose et sur gélose nutritive ordinaire, fermentent le glucose avec production de gaz. Ne possédant pas d'oxydase, réduisant les nitrates en nitrites (Avril *et al.*, 1992).

III.3.2.1. *Escherichia coli***a. Caractères bactériologiques**

C'est un hôte normal du tube digestif de l'homme et des animaux (Avril *et al.*, 1992), *E. coli* est un bacille à Gram négatif. Il se développe sur gélose ordinaire, produit l'indole, fermente le lactose (Fauchère et Avril, 2002). Les colonies ont en moyenne 2mm de diamètre, elles sont rondes, plates et à bords réguliers (Joly et Reynaud, 2003).

b. Pouvoir pathogène

E. coli est fréquemment impliqué en pathologie infectieuse aussi bien en milieu hospitalier (Lavigne *et al.*, 2002). Elle possède des propriétés particulières (pouvoir d'adhésion, production de toxines) nécessaires au pouvoir infectieux (Joly et Reynaud, 2003).

III.3.2.2. *Klebsiella pneumoniae***a. Habitat**

Elles sont fréquemment isolées des eaux, du sol et des végétaux. Elles sont présentes dans la flore fécale de l'homme et sont souvent commensales de la peau, des muqueuses et des voies respiratoires (Schaechter *et al.*, 1999).

b. Caractères bactériologiques et biochimiques

Bacille, Gram négatif, les colonies généralement rondes, de 3 à 4mm de diamètre, bombées, muqueuses et ayant une tendance à la confluence (Denis *et al.*, 2007), elle est lactose (+), uréase (+), VP (+), ONPG (+), LDC (+), glucose(+) et gaz(+) (Avril *et al.*, 1992).

c. Pouvoir pathogène

Les *K. pneumoniae* sont isolées de broncho-pneumopathies aiguës ou subaiguës, mais aussi d'infections urinaires, hépato-biliaires ou de pus divers (Schaechter *et al.*, 1999).

III.3.2.3. *Enterobacter gergoviae***a. Habitat et caractères bactériologiques**

Sont des commensaux du tube digestif de l'homme et des animaux. On les trouve dans les eaux, sur le sol, sur la peau et les muqueuses, elle possède une uréase, LDC+, ODC+ (Avril *et al.*, 1992).

b. Pouvoir pathogène

Ces bactéries opportunistes peuvent être responsables de septicémies, de méningites, d'infections urinaires, d'infections néonatales et de suppurations diverses (Avril *et al.*, 1992).

III.3.2.4. *Proteus mirabilis* et *P. vulgaris***a. Caractères bactériologiques**

P. mirabilis et *P. vulgaris* sont des bacilles très polymorphes, les souches très mobiles sont pourvues de longs flagelles (Avril *et al.*, 1992). En milieu gélose, *P. mirabilis* et *P. vulgaris* peuvent envahir la surface du milieu en formant des ondes concentriques. Cet essaimage est dû à la grande mobilité de la bactérie (Avril *et al.*, 1992).

b. Caractères biochimique

Les *Proteus* sont caractérisés par leur uréase très active, la production d'H₂S, d'une gélatinase et leur pouvoir glucidolytique faible. *P. mirabilis* est indole- et ODC+, tandis que *P. vulgaris* est indole+ et ODC- (Avril *et al.*, 1992).

III.3.2.5. *Citrobacter koseri***a. Habitat et pouvoir pathogène**

Les *Citrobacter* sont des bactéries commensales du tube digestif de l'homme et des animaux à sang chaud. Ils sont trouvés dans les eaux. Ils peuvent être isolés occasionnellement d'urines ou de suppurations diverses (Avril *et al.*, 1992).

b. Caractères biochimiques : Indole+, Citrate de Simmons +, LDC -, ODC +, Lactose – (Denis *et al.*, 2007).

IV.1 Matériels

IV.1.1. Matériel végétal

Extrait méthanolique de fruit de *Crataegus monogyna*.

IV.1.2. Matériel bactériologique

- Les souches utilisées sont récupérées du laboratoire d'analyse BEKIOUA de Jijel et l'hôpital de Taher :

- *Klebsiella pneumoniae*.
- *Staphylococcus aureus*.
- *Citrobacter koseri*.
- *Proteus mirabilis*.
- *Proteus vulgaris*.
- *Enterobacter gergovie*.
- *Escherichia coli*.

- Les souches de références sont récupérées du CHU de Constantine :

- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.
- *Escherichia coli* ATCC 25922.

IV.1.3. Milieux de culture

- 1- Gélose Héктоen.
- 2- Gélose Chapman.
- 3- Gélose Mueller-Hinton.
- 4- Bouillon nutritif.

IV.2. Méthodes

IV.2.1. Extraction

Le matériel végétal étudié est le fruit, seulement la partie charnue dénoyautée du fruit, comestible par l'être humain. Les fruits de *Crataegus monogyna* ont été récoltés en Septembre-Octobre 2014 de Constantine.

IV.2.1.1. Dépulpage

Le dépulpage a été effectué manuellement, cette opération a pour but de séparer la pulpe du noyau. La partie charnue dénoyautée a été séchée à l'ombre et à l'abri de la lumière, dans un endroit sec et aéré à température ambiante. Devenu sec, le fruit est conservé dans des sacs en papier et stocké dans un endroit sec et aéré pour d'éventuelles utilisations. Afin de préserver au maximum l'intégrité des molécules, en minimisant les divers mécanismes de fermentation et de dégradation inhérents aux caractères organiques de ces matières premières.

IV.2.1.2. Procédés d'extraction

Une macération aqueuse a également été effectuée sur 120.38g de fruits de *Crataegus monogyna* avec de méthanol/ H₂O (80:20 v/v).

La solution a été filtrée et placée sous agitation électromagnétique pendant 24 heures. **Après filtration** la solution hydro-alcoolique a été concentrée sous pression réduite pour obtenir l'extrait méthanolique de masse (m=14.31g) (Drissa *et al.*, 2004).

IV.2.2. Identification des souches bactériennes

Dans cette opération on réalise des repiquages sur milieux liquides (Bouillon nutritif), milieux solides sélectif (Chapman pour *S. aureus*, Héктоen pour les autres souches) dans le but d'obtention des souches jeunes.

La provenance des souches de références (ATCC), étaient du centre Hospitalo-Universitaire de Constantine (CHU).

Les souches étudiées sont pré-identifiées au laboratoire d'analyse BEKIOUA de Jijel et durant leur stockage, elles en étaient contaminées ce qui nous a conduit à passer à la deuxième identification dans le but d'une confirmation.

IV.2.2.1. Coloration de Gram

Un frottis fixé à la chaleur est coloré pendant une minute au violet de gentiane; il est ensuite rincé rapidement à l'eau courante, traité pendant une minute par une solution de lugol, et de nouveau rincé rapidement.

On soumet alors le frottis coloré à une étape de décoloration en le traitant avec l'éthanol 95%. Il s'agit de l'étape critique: la lame est maintenue inclinée et on fait couler le solvant sur le frottis pendant 2 à 3 secondes seulement jusqu'à ce que le colorant cesse de s'échapper librement du frottis. Celui-ci est alors immédiatement rincé à l'eau courante.

À ce stade les cellules Gram- seront incolores, les cellules Gram+ violettes. On soumet ensuite le frottis à une contre coloration de 30 secondes à la fushine pour colorer les cellules Gram- présentes. Après un bref rinçage, on sèche le frottis au papier buvard et on l'examine à l'objectif à immersion (grossissement X 1000) (Prescott *et al.*, 2003).

IV.2.2.2. Tests biochimiques

a. Type respiratoire

➤ Test de catalase

Pendant leur respiration aérobie certaines bactéries produisent du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), celui-ci est très toxique et certaines bactéries sont capables de le dégrader grâce aux enzymes qu'elles synthétisent et notamment la catalase. Cette enzyme est capable de décomposer l'eau oxygénée.

Une colonie est mise en suspension avec une ou deux gouttes de solution de peroxyde d'hydrogène (10 volumes) sur une lame. La réaction positive se traduit par un dégagement immédiat de bulles de gaz (O_2) (Delarras, 2007).

➤ Nitrate réductase

- Le bouillon nitrate est ensemencé avec la bactérie à étudier et incubé 18 heures à 37°C.
- Ajouter à la surface du milieu 3 gouttes d'acide sulfanilique puis 3 gouttes d'alpha naphthylamine.

*** Lecture**

- Le milieu devient rouge : présence de nitrites. Donc la bactérie possède une nitrate réductase.
- Le milieu reste inchangé : on ajoute alors de la poudre de zinc qui joue le même rôle que le nitrate réductase vis-à-vis des nitrates.

- Résultat Nitrate réductase négative : Coloration rouge, on a eu donc transformation des nitrates en nitrites par le zinc. La bactérie ne possédait pas l'enzyme.
- Résultat Nitrate réductase positive : Pas de coloration, les nitrates ont été transformés par la bactérie au delà des nitrites. La bactérie possède l'enzyme (Denis *et al.*, 2007).

b. Métabolite glucidique**➤ Milieu Mannitol-mobilité**

Le mannitol est un produit de réduction du D-mannose. Il permet de rechercher simultanément la fermentation du mannitol et la mobilité. On a ensemencé les souches étudiées dans le milieu par piqûre centrale, et incubé à 37°C pendant 18 à 24h.

• Lecture

Le virage au jaune du milieu indique la fermentation du mannitol, une diffusion dans la gélose indique la mobilité des bactéries (Delarras, 2007).

➤ TSI (Gélose Glucose-Lactose-Saccharose-H₂S)

A l'aide d'une anse contenant des colonies prélevées, on ensemence la pente puis le culot d'un tube par piqûre centrale. L'incubation se fait à 37°C pendant 48 à 72h.

*** Lecture**

- * Une coloration jaune de la pente indique un lactose positif.
- * Une coloration jaune du Culot montre un glucose positif.
- * Une coloration jaune de la zone intermédiaire indique un saccharose positif.

Ce test permet également la production de H₂S (noircissement de la zone joignant la pente et le culot) et de Gaz (bulles dans la gélose) (Delarras, 2007).

➤ Citrate de Simmons

Ce milieu ne contient qu'une seule source de carbone: le citrate. Seules les bactéries possédant une citrate-perméase sont capables de se développer sur ce milieu. La pente du milieu est ensemencée selon un strie longitudinale au moyen d'une anse contenant une colonie et incubé à 37°C pendant 24 heures.

*** Lecture**

- * Citrate-positif : culture avec alcalinisation du milieu (virage de l'indicateur au bleu).
- * Citrate-négative: pas de culture (coloration verte de milieu inchangée) (Marchal *et al.*, 1991).

➤ **VP/RM**

Deux tubes contenant chacun 5ml de milieu **Clark** et **Lubs** sont ensemencés à l'aide d'une anse, après incubation à 37°C pendant 18 à 48h, on ajoute deux gouttes de réactif VP dans l'un des deux tubes et deux gouttes de réactif RM dans l'autre.

*** Lecture**

- Une teinte rouge cerise indique une réaction VP positive.
- Une teinte rouge indique une réaction RM positive (**Marchal et al., 1991**).

➤ **ONPG (recherche de β Galactosidase)**

- Réaliser une suspension épaisse des bactéries testées en eau distillée.
- Ajouter avec une pince flambée mais refroidie un disque imprégné d'ONPG.
- Incuber 30min à 37°C.

*** Lecture**

- Milieu jaune : ONPG +
- Milieu sans couleur : ONPG – (**Denis et al., 2007**).

c. Métabolisme protéique

➤ **Recherche des décarboxylases (LDC, ODC, ADH)**

Le test peut être effectué sur le milieu de Taylor contenant l'acide aminé étudié (la lysine, l'arginine ou l'ornithine), du glucose et un indicateur coloré, le bromocréysol pourpre.

- La réaction s'effectue en deux temps. Lorsque le glucose est fermenté, il y a virage au jaune du bromocréysol pourpre ; lorsque l'acide aminé décarboxylé, il y a une ré-acidification du milieu qui vire au violet après 18 h à 37°C, un milieu violet trouble correspond à une réaction positive (**Denis et al., 2007**).

IV.2.3. Antibiogramme de vérification de souches testées sur milieu solide

IV.2.3.1. Définition de l'antibiogramme

L'antibiogramme a pour but de déterminer la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) d'une souche bactérienne vis-à-vis de divers antibiotiques. La détermination de cette valeur est peu précise, mais elle est consacrée par l'usage et elle bénéficie d'une masse importante d'informations recueillies à son sujet (**Burnichon et Texier., 2003**).

IV.2.3.2. Réalisation

a. Préparation des disques

L'antibiogramme se fait à partir de la préparation des disques, dont le papier Wathman N°3, est découpé en disques blancs de 6mm. Puis stérilisé à l'autoclave à 120°C/20 min . Ensuite, ils sont placés dans des boîtes de Pétri ou ils ont subi un séchage avant d'être déposés sur le milieu de culture (**Bonnet et al., 2013**).

b. Préparation de l'inoculum

A partir d'une culture de 18h, la suspension est calibrée pour avoir un inoculum de 108 UFC/ml, correspondant à une densité optique de 0,08 à 0,1 à une longueur d'onde de 625nm, soit une densité égale à 0,5 Mc Ferland (**CA-SFM, 2003**).

c. Préparation des dilutions

Les dilutions de l'extrait méthanolique utilisées sont préparées selon la méthode de (Carbonelle *et al.*, 1987 ; Courvalin *et al.*, 1988), présentées dans le tableau IV.1

Tableau IV.1. Les dilutions de la solution mère

Concentration initiale en µg/ml	Volume en ml	Volume d'eau distillée en ml	Concentration finale en µg/ml
50000	6.4	3.6	3200
3200	2	2	1600
	1	3	800
	0.5	3.5	400
	0.5	7.5	200
200	2	2	100
	1	3	50
	0.5	3.5	25
	0.5	7.5	12.5
12.5	2	2	6.25
	1	3	3.125
	0.5	3.5	1.56
	0.5	7.5	0.78

d. Ensemencement

- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne.
- L'essorer en le pressant fermement sur la paroi interne du tube, afin de décharger au maximum.
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées.
- Dans le cas où on ensemence plusieurs boîtes de Pétri, on recharge l'écouvillon à chaque fois (Rahal, 2003).

e. Application des disques

Les disques préparés sont disposés à la surface de milieu de culture, en appuyant légèrement à l'aide d'une pince stérilisées, puis à l'aide d'une micropipette on décharge 20µl depuis chaque dilution de l'extrait au centre du disque, ensuite ces boîtes sont incubées à l'étuve à 37°C pendant 24 h (Mehani et Segni, 2014).

f. Lecture des résultats

Nous avons procédé à la mesure du diamètre des zones d'inhibitions (Mehani et Segni, 2014).

IV.2.4. Détermination de la CMI**IV.2.4.1. Définition**

Elle est définie par le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) comme étant la plus faible concentration d'une gamme de dilutions d'antibiotique de demi en demi qui entraîne l'inhibition de toute croissance bactérienne visible (Burnichon et Texier., 2003).

IV.2.4.2. Réalisation (Bonnet *et al.*, 2013).**a. Préparation de la solution mère de l'extrait méthanolique**

La solution a été préparée en solubilisant 50mg de l'extrait méthanolique de la plante dans une solution de 10ml d'eau distillée et on appelle cette solution, la solution mère. A partir de la solution mère on réalise une série des dilutions

b. Préparation des boites

- Distribuer 2ml de chaque dilution dans des boites.
- Ajouter 18ml de Mueller-Hinton gélosé maintenu en surfusion à 45°C.
- Homogénéiser et laisser les boites se solidifier à la température ambiante.
- Sécher les boites à 37°C pendant 30minutes à l'étuve.

c. Préparation de l'inoculum

Préparer des suspensions de densité de 108UFC/ml pour chacune des souches à tester.

- Le repiquage ce fait par 0,1 et 0,3ml, respectivement pour les bacilles à Gram négatif, Staphylocoque et *P. aeruginosa* de la culture de 18 heures dans 10ml de bouillon nutritif, puis les incubent pendant 3heures à 37°C à l'étuve. Ensuite en ajoute 1ml de ce bouillon à 10ml de bouillon nutritif.

d. Ensemencement

On ensemence en strie, à l'aide d'une pipette Pasteur sur toutes les boites. On incube les boites pendant 18 à 37°C.

e. Lecture

La lecture se fait après 24heures d'incubation. La CMI est la plus faible concentration pour laquelle la croissance est inhibée.

V.1. Résultats**V.1.1. Extraction**

L'extrait méthanolique de *Crataegus monogyna* a un aspect liquide fluide et mobile, de couleur marron et d'odeur spécifique, avec une masse finale de 14.31g. L'extrait a été conservé à l'abri de la lumière jusqu'à leur utilisation.

V.1.2. Identification des souches

Les cultures obtenues sur les boîtes de Pétri sont observées à l'œil nu pour caractériser la forme, la taille, l'aspect ainsi que la couleur des colonies.

La coloration de Gram des colonies isolées sur milieu Chapman nous a permis de confirmer la souches de *Staphylococcus aureus*, la coloration nous a donné des cocci à Gram positif en grappe de raisin.

Ainsi que, la coloration de Gram des colonies isolées sur milieu Héктоen des six souches nous a donné des bacilles, cocobacilles et diplobacilles à Gram négatif.

Ces résultats nous a permis de confirmer l'appartenance des souches à la famille des entérobactéries.

Les résultats de la coloration de Gram, type respiratoire, métabolite glucidique et métabolisme protéique sont résumés respectivement dans les tableaux V.1, V.2, V.3, V.4.

Tableau V.1 : Résultats de la coloration de Gram des souches étudiés.

Souches	Coloration de Gram
S1	-
S2	-
S3	-
S4	-
S5	-
5	-
2	+

Tableau V.2 : Résultat de type respiratoire.

Souches	Catalase	Nitrate réductase
S1	+	+
S2	+	+
S3	+	+
S4	+	+
S5	+	+
5	+	+
2	+	+

Tableau V.3 : Résultat de métabolite glucidique.

Souches	Mannitol Mobilité		Clark et Lubs		Citrate de Simmons	TSI				ONPG
	Mannitol	Mobilité	VP	RM		Glucose	Lactose	Gaz	H ₂ S	
S1	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
S2	+	+	-	+	+	+	+	+		+
S3	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
S4	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
S5	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
5	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+
2	+	-	+	-	/	+	/	/	/	/

Tableau V.4: Résultat de métabolisme protéique.

Souches	LDC	ODC	ADH
S1	-	-	-
S2	-	+	-
S3	-	+	-
S4	+	+	-
S5	-	+	-
5	+	-	+

D'après les résultats on a confirmé que nos souches sont :

- S1 → *Proteus vulgaris.*
- S2 → *Citrobacter koseri.*
- S3 → *Enterobacter gergovie.*
- S4 → *Escherichia coli.*
- S5 → *Proteus mirabilis.*
- 5 → *Klebsiella pneumoniae.*
- 2 → *Staphylococcus aureus.*

V.1.3. Activité antibactérienne

Nous avons évalué l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique de *Crataegus monogyna* par la méthode de diffusion en milieu solide. Les valeurs indiquées sont les moyennes de deux mesures.

L'action antibactérienne se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour du disque de papier imprégné d'extrait brut étudié. Le diamètre de la zone d'inhibition diffère d'une bactérie à une autre.

Cette activité a été révélée sur :

❖ Trois souches bactériennes de références:

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.
- *Escherichia coli* ATCC 25922.

❖ Sept souches bactériennes résistantes aux antibiotiques :

Proteus mirabilis
Proteus vulgaris
Enterobacter gergovie
Citrobacter koseri
Escherichia coli
Staphylococcus aureus
Klebsiella pneumoniae

Ensuite pour chaque disque nous avons mesuré les diamètres des zones d'inhibition de croissance des cultures bactériennes.

Nous avons réalisé un antibiogramme pour prédire la sensibilité des souches testées à un ou plusieurs antibiotiques.

V.1.3.1. Antibiogramme des souches testées sur milieu solide

La lecture des antibiogrammes effectuée sur les différentes bactéries a permis de déterminer la sensibilité et la résistance de nos souches à trois antibiotiques. Le test d'antibiogramme a été effectué sur milieu solide avec la gélose de Muller Hinton. Les antibiotiques utilisés sont la (P5 μ g), (AML25 μ g) et la (CT50 μ g).

A partir des résultats obtenus, toutes les souches sont sensibles à la Colistine sulfate avec des diamètres d'inhibition de 10mm, 16mm et 17 ± 1.41 mm, pour *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 respectivement.

Cependant, les diamètres d'inhibition vis-à-vis l'Amoxicilline sont 46mm, 8mm respectivement pour *S. aureus* ATCC, *E. coli* ATCC, contrairement à *P. aeruginosa* ATCC 27853 qui est résistante.

Concernant la Pénicilline G, les deux souches *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 sont sensibles à cet antibiotique avec des diamètres d'inhibition de 36mm, 8mm. Contrairement à *P. aeruginosa* ATCC 27853 qui est résistante.

Les sept souches testées présentent une résistance remarquable vis-à-vis l'Amoxicilline et la Pénicilline G, et une sensibilité à la Colistine sulfate, leur profil de susceptibilité est reporté dans les tableaux (V.5), et les zones d'inhibition sont présentées dans les figures (V.1, V.2).

Tableau V.5 : Résultat de l'antibiogramme.

Souches	Antibiotique	Diamètres des zones d'inhibition en (mm)
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	Pénicilline G	36
	Amoxicilline	46
	Colistine sulfate	10
<i>E. coli</i> ATCC25922	Pénicilline G	8
	Amoxicilline	8
	Colistine sulfate	16
<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	Pénicilline G	R
	Amoxicilline	R
	Colistine sulfate	17 ± 1.41
<i>P. vulgaris</i>	Pénicilline G	R
	Amoxicilline	R
	Colistine sulfate	18 ± 2.82
<i>P. mirabilis</i>	Pénicilline G	R
	Amoxicilline	R
	Colistine sulfate	17 ± 1.41
<i>E. gergoviae</i>	Pénicilline G	R
	Amoxicilline	R
	Colistine sulfate	17 ± 1.41
<i>E. coli</i>	Pénicilline G	R
	Amoxicilline	R
	Colistine sulfate	18 ± 0
<i>C. kosri</i>	Pénicilline G	R
	Amoxicilline	R
	Colistine sulfate	16 ± 2.82
<i>S. aureus</i>	Pénicilline G	R
	Amoxicilline	R
	Colistine sulfate	18 ± 2.82
<i>K. pneumoniae</i>	Pénicilline G	R
	Amoxicilline	R
	Colistine sulfate	16 ± 2.82

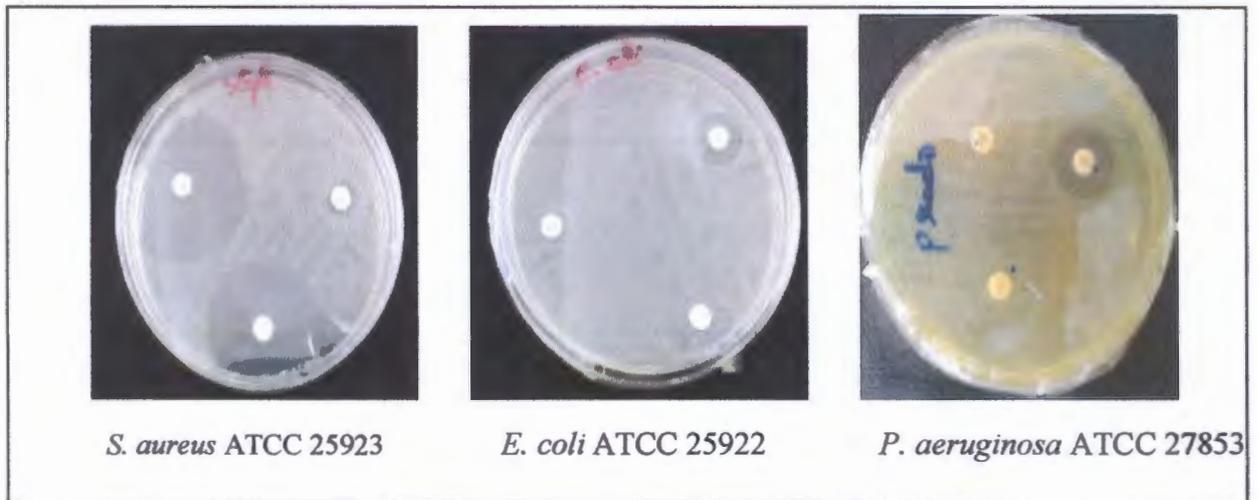


Figure V.1 : L'antibiogramme des souches de références.

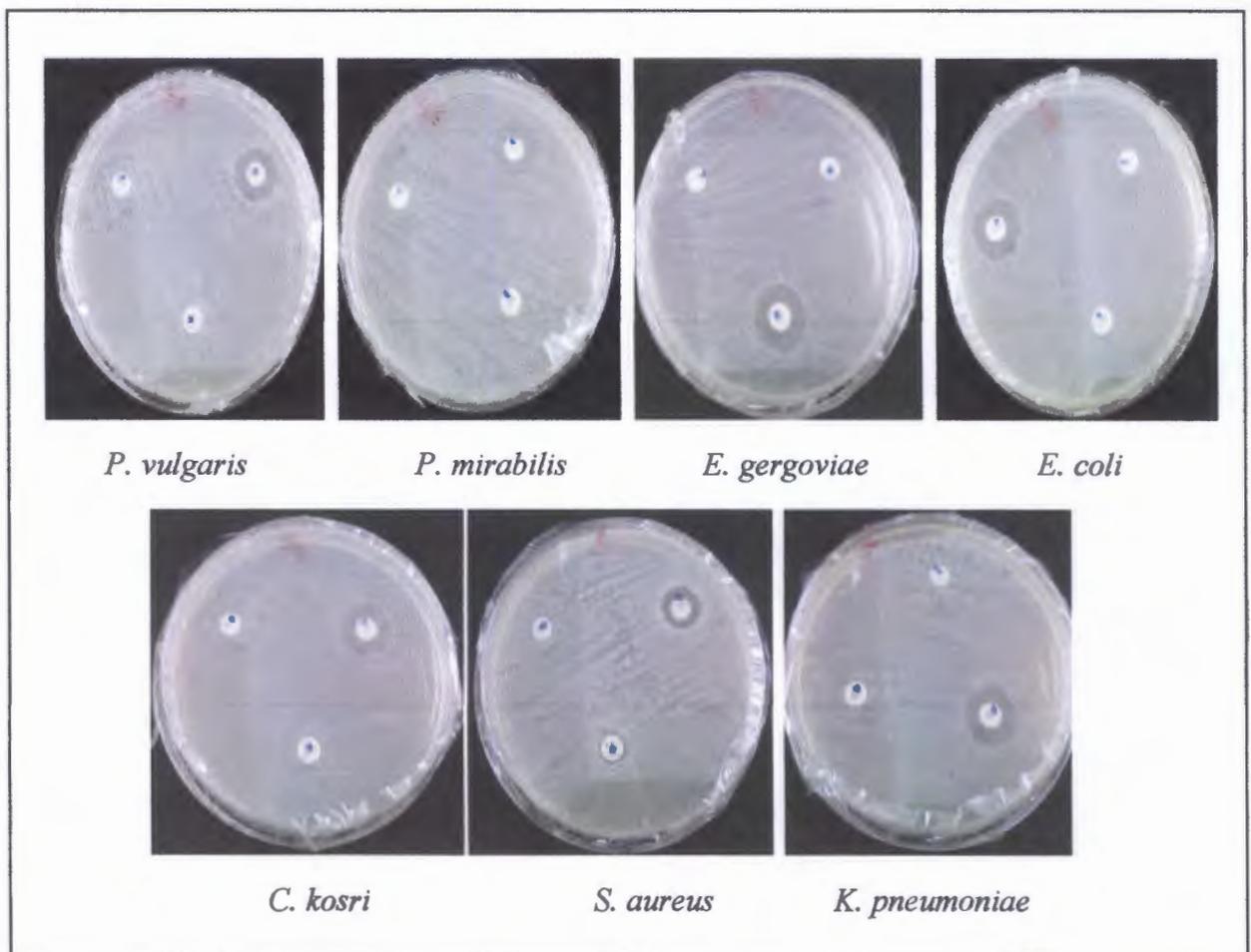


Figure V.2 : L'antibiogramme des souches testées.

V.1.3.2. Aromatogramme sur milieu solide

L'extrait méthanolique de *Crataegus monogyna* donne des diamètres d'inhibition allant de $11 \pm 1.41\text{mm}$ à $9 \pm 1.41\text{mm}$ pour *S. aureus* ATCC 25923, de $12 \pm 0\text{mm}$ à $9 \pm 1.41\text{mm}$ pour *E. coli* ATCC 25922 et de $11 \pm 1.41\text{mm}$ à $10 \pm 0\text{mm}$ pour *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Concernant les autres souches testées on observe une hétérogénéité dans les diamètres des zones. Dont les deux espèces de *Proteus* présente des zones d'inhibition de $12 \pm 2\text{mm}$ à $11.33 \pm 1.15\text{mm}$ pour *P. vulgaris* et de $12 \pm 2.82\text{mm}$ à $11 \pm 1.41\text{mm}$ pour *P. mirabilis*. Tant qu'*E. gergoviae* présente des zones varient de $12.67 \pm 1.15\text{mm}$ à $10 \pm 2\text{mm}$, et de $11.33 \pm 1.15\text{mm}$ à $10 \pm 1.15\text{mm}$ pour *E. coli*. Cependant, *C. kosri* donne des zones de $11.33 \pm 1.15\text{mm}$ à $10.67 \pm 1.15\text{mm}$, ainsi que *K. pneumoniae* montre des zones de $13 \pm 1.41\text{mm}$ à $11 \pm 1.15\text{mm}$.

Pour *S. aureus* les zones sont de $11.33 \pm 1.15\text{mm}$ à $9.33 \pm 1.15\text{mm}$. Leur profil de sensibilité est reporté dans les tableaux(V.6), et les zones d'inhibition sont présentées dans les figures (V.3, V.4).

Tableau V.6 : Résultats d'aromatogramme des souches testées.

Souches	Diamètres des zones d'inhibition en (mm)				
	Dilutions de l'extrait méthanolique				
	SM	1/2	1/4	1/8	1/16
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	11 ± 1.41	10 ± 0	10 ± 0	9 ± 1.41	9 ± 1.41
<i>E. coli</i> ATCC 25922	12 ± 0	11 ± 1.41	10 ± 0	10 ± 0	9 ± 1.41
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	11 ± 1.41	10 ± 0	10 ± 1.41	10 ± 0	10 ± 0
<i>P. vulgaris</i>	12 ± 2	12 ± 2	11.33 ± 1.15	11.33 ± 1.15	11.33 ± 1.15
<i>P. mirabilis</i>	12 ± 2.82	11.33 ± 1.15	11.33 ± 1.15	11 ± 1.15	11 ± 1.41
<i>E. gergoviae</i>	12.67 ± 1.15	12.67 ± 1.15	11.33 ± 1.15	10.67 ± 3.05	10 ± 2
<i>E. coli</i>	11.33 ± 1.15	10.67 ± 1.15	10.67 ± 1.15	10 ± 2	10 ± 1.15
<i>C. kosri</i>	11.33 ± 1.15	11.33 ± 1.15	11.33 ± 1.15	10.67 ± 1.15	10.67 ± 1.15
<i>S. aureus</i>	11.33 ± 1.15	11.33 ± 1.15	11 ± 1.41	11 ± 1.41	9.33 ± 1.15
<i>K. pneumoniae</i>	13 ± 1.41	12 ± 0	11.33 ± 1.15	11.33 ± 1.15	11 ± 1.15

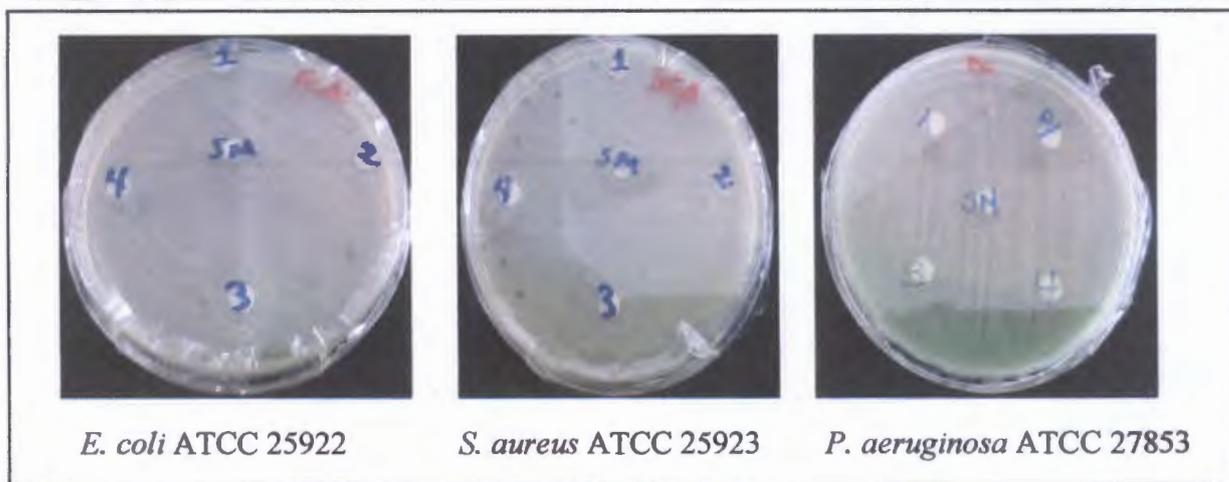


Figure V.3 : Aromatogramme des souches de références

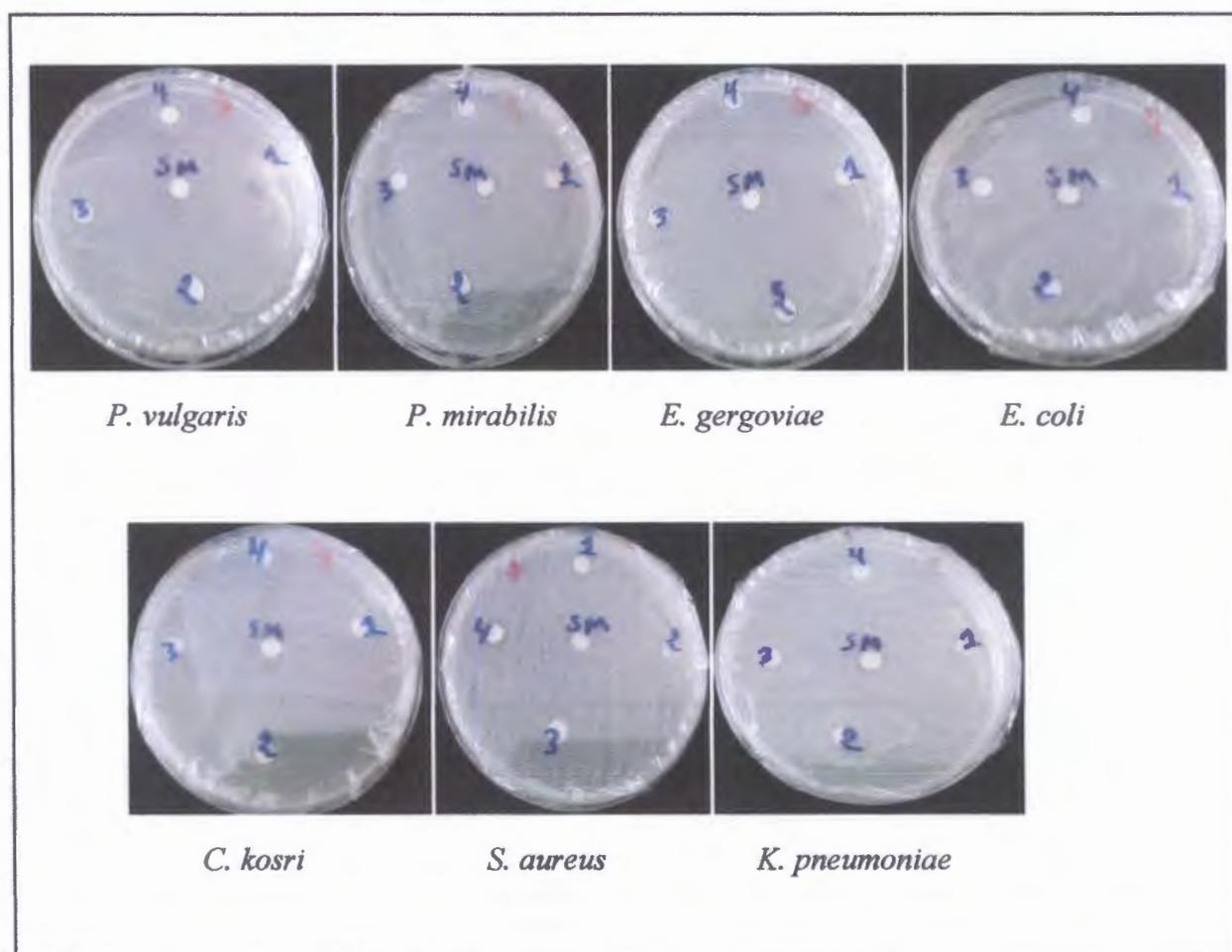


Figure V.4 : Aromatogramme des souches testées.

V.1.4. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrices

Selon le tableau (V.7) l'extrait méthanolique de *Crataegus monogyna* montre une sensibilité avec les souches testées. Les CMI's obtenues pour ces bactéries vont de 12.5 µg/ml à 25 µg/ml.

Plus exactement, elles sont de 25 µg/ml pour *S. aureus* ATCC 27923, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. gergoviae*, *E. coli* et *S. aureus* correspondants à la dilution 1/128. Et de 12.5 µg/ml pour *P. vulgaris*, *P. mirabilis*, *K. pneumoniae* et *C. kosri* correspondants à la dilution 1/256.

Tableau V.7 : Résultat de la concentration minimale inhibitrice.

Souches	Concentration minimale inhibitrice en (µg/ml)
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	25
<i>E. coli</i> ATCC25922	25
<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	25
<i>P. vulgaris</i>	12.5
<i>P. mirabilis</i>	12.5
<i>E. gergoviae</i>	25
<i>E. coli</i>	25
<i>C. kosri</i>	12.5
<i>S. aureus</i>	25
<i>K. pneumoniae</i>	12.5

V.2. Discussion

L'activité antibactérienne des substances actives d'origine végétale dépend surtout de la nature des bactéries Gram positif ou Gram négatif (Basli *et al.*, 2012).

Cette étude avait pour objectif de déterminer l'effet antibactérien de l'extrait méthanolique du fruit de *Crataegus monogyna* sur les bactéries résistantes. D'après les résultats obtenus, on a observé que l'extrait méthanolique exerce une activité antibactérienne plus faible à celle de Colistine sulfate, qui est le seul antibiotique qui donne des zones avec des diamètres importants et une activité plus forte que celle de l'Amoxicilline et la Pénicilline qui n'ont aucune activité sur les souches testées sauf avec les souches de références.

D'après (Nauciel et Vildé, 2005), La pénicilline G est active seulement sur les cocci, les bacilles à Gram positif, et inactive sur la plupart des bacilles à Gram négatif. En plus, l'Amoxicilline a un spectre d'activité élargi vers certains bacilles à Gram négatif. Concernant la Colistine sulfate, elle est active contre les bacilles à Gram négatif potentiellement multi-résistantes (Kipnis et Guery, 2010).

Pour (Biyiti *et al.*, 2004), qui ont mis en évidence l'activité antibactérienne de quatre plantes médicinales camerounaises vis-à-vis de *E. coli*, *P. aeruginosa* et *S. aureus*, un extrait est considéré comme actif lorsqu'il induit une zone d'inhibition supérieure ou égale à 10mm avec une concentration d'extrait de 100µl.

Les diamètres de zone d'inhibition étant tous supérieurs à 10mm, et la concentration d'extrait méthanolique déposée sur le disque dans notre test est de 20µl, on pourrait donc dire que l'extrait méthanolique du fruit de *Crataegus monogyna* a probablement une activité antibactérienne. Puisque la plus forte activité a été obtenue avec un diamètre de zone d'inhibition de 13 ± 1.41 mm à la concentration de 3200µg/ml, chez la souche de *K. pneumoniae* ; tandis que la plus faible activité a été enregistrée chez *P. aeruginosa* ATCC 27853 avec un diamètre de zone d'inhibition de 11 ± 1.41 mm.

(Belkhir *et al.*, 2013), ont fait une analyse comparative entre l'activité antioxydante et antimicrobiennes de *Crataegus azarolus* et *Crataegus monogyna* qui ont démontré que l'extrait du fruit de *Crataegus monogyna* présente une activité antibactérienne modeste contre les souches de références : *E. coli* ATCC 8739, *P. aeruginosa* ATCC 9027 et *S. aureus* ATCC 6538 avec des CMI respectivement de 538.05 ± 4.80 (µg/mL), 358.70 ± 3.20 (µg/mL), 134.51 ± 1.20 (µg/ml); ces résultats nous ont permis d'accepter les valeurs marquées chez les souches de références testées.

L'activité antibactérienne sur *S. aureus* d'extrait méthanolique est de 12.67 ± 1.15 mm avec une CMI de 25 µg/ml, elle pourrait s'expliquer par la probabilité de sensibilité des bactéries Gram (+) aux changements externes, tels que la température, le pH, et les extraits naturels dues à l'absence de la membrane externe (Balentine *et al.*, 2006).

Pour les six souches Gram négatif restantes cette sensibilité n'est pas surprenante, elle est en relation avec la nature de leurs membranes externes (imperméable à la plupart des agents biocides) (Fauchère et Avril, 2002).

Bouزيد et ses collaborateurs (2011), ont démontré que l'extrait méthanolique de *Crataegus monogyna* renferme une quantité appréciable de polyphénols (notamment les flavonoïdes, les tanins, les acides phénoliques, les terpènes et les pectines), mais il n'a montré qu'une faible activité antibactérienne sur les souches testées. Il se peut que son activité soit masquée par la présence des sucres. Et d'après l'étude de (Gundogdu *et al.*, 2014),

le fructose est le prédominant sucre dans *Crataegus monogyna* avec une teneur de 18.378g/100 g. Cela peut justifier l'activité modeste de l'extrait.

Il a été montré par Falleh et ses collaborateurs (2008) que l'extrait méthanolique des feuilles de *Cynara cardunculus L* (astéracées) était actif contre deux souches utilisées dans notre étude à savoir *Escherichia coli*, et *Pseudomonas aeruginosa*. Cette activité est reliée à la présence de composés antibiotiques ou des toxines métaboliques qui sont probablement absents dans l'extraits de la *Crataegus monogyna* dans la limite de ne pas savoir leur composition. L'activité d'un extrait est probablement due à la présence de synergie entre un nombre de composants, qui lorsqu'ils sont séparés deviennent inactifs individuellement (Sarker *et al.*, 2005).

Par comparaison avec les résultats des ces travaux similaires, nos résultats sont compatibles à ces derniers.

À l'issu de ce travail, nous déduisons que l'extrait méthanolique de *Crataegus monogyna* possède une activité antibactérienne acceptable sur les souches résistantes aux antibiotiques.

De nos jours, l'utilisation des plantes médicinales en phytothérapie a reçu un grand intérêt dans la recherche biomédicale et devient aussi importante que la chimiothérapie.

Ce regain d'intérêt vient d'une part du fait que les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances et de composés naturels bioactifs et d'autre part du besoin de la recherche d'une meilleure médication par une thérapie plus douce sans effets secondaires.

Les extraits bruts des plantes commencent à avoir beaucoup d'intérêt comme source potentielle de molécules naturelles bioactives. Ils font l'objet d'étude pour leur éventuelle utilisation comme alternative pour le traitement des maladies infectieuses et pour la protection des aliments contre l'oxydation.

Actuellement, le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques et la toxicité des antioxydants synthétiques, pousse les chercheurs à puiser dans le monde végétal et particulièrement les plantes médicinales et culinaires en quête de molécules naturelles efficaces et dénuées de tout effet adverse. De nombreuses études ont mis en évidence la présence de métabolites secondaires doués d'activités biologiques telles que les polyphénols, alcaloïdes, terpènes ...etc.

Ce travail vise à étudier l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique du fruit de *Crataegus monogyna* qui appartiennent à la famille des Rosacées, vis-à-vis les bactéries résistantes aux antibiotiques.

Pour l'obtention d'extrait, nous avons réalisé une extraction aqueuse par une macération par l'eau et le méthanol. L'activité antibactérienne a été déterminée sur dix souches bactériennes dont trois sont des souches de références et les sept restantes sont résistantes aux antibiotiques, selon la méthode de diffusion sur milieu solide.

L'utilisation des tests biochimiques nous a permis de confirmer l'identification de souches testées, ainsi que la réalisation de l'antibiogramme sur le milieu solide par la méthode de disque qui nous a permis de découvrir la sensibilité des bactéries aux différentes concentrations de l'extrait et de déterminer les CMI.

Les résultats indiquent que l'extrait méthanolique de *Crataegus monogyna* possède une activité antibactérienne acceptable sur toutes les souches testées.

Nos résultats montrent que l'extrait brut testé témoigne d'activité antibactérienne. Les résultats restent préliminaires, il serait donc intéressant de poursuivre les investigations sur ce fruit en se focalisant sur l'isolement des substances qui se tendent sur ses diverses activités détectées.

D'autres études approfondies sont nécessaires et se résument dans les points suivants :

- ✚ Établir une relation entre sa composition chimique et ses activités biologiques.
- ✚ l'évaluation de l'activité antibactérienne de cette plante et de l'extrait vis-à-vis d'autres souches bactériennes est nécessaire.
- ✚ Isolement et caractérisation des composés actifs dans l'extrait par des méthodes plus spécifiques.
- ✚ Evaluer d'autres effets biologiques *in vitro* comme *in vivo* de l'extrait brut et de ses composés actifs en utilisant différentes techniques.

Glossaire

- **Palpitation** : Correspond au fait de ressentir ses propres battements cardiaques de façon désagréable. Les épisodes peuvent durer de quelques secondes à plusieurs heures, être quotidiens ou plus rares. Ils peuvent être bien ou mal tolérés. S'ils sont associés à des signes fonctionnels comme un malaise ou une douleur thoracique, une exploration est nécessaire.
- **Spasmes vasculaires** : C'est le rétrécissement temporaire d'un conduit (canal, vaisseau, bronche) survenu à la suite d'une contraction involontaire de ses fibres musculaires.
- **La tachycardie** : Correspond à un rythme cardiaque plus rapide que la normale. Le contraire d'une tachycardie est une bradycardie, c'est-à-dire un rythme cardiaque lent. Le verbe correspondant est : tachycardiser, qui signifie avoir un rythme cardiaque rapide.
- **L'athérosclérose** : Il s'agit de la perte d'élasticité des artères due à la sclérose, elle même provoquée par l'accumulation de corps gras au niveau de la tunique interne des artères. Ce dépôt constitue alors l'athérome qui pourra aller de la simple plaque rétrécissant la lumière artérielle jusqu'à l'oblitération du vaisseau .
- **La lithiase urinaire** : C'est une maladie caractérisée par la formation de calculs (du latin : *calculus*, caillou), accrétiens (cristallines) solides de minéraux dissous dans l'urine et qui se forment dans les reins ou les uretères.
- **Les bouffées congestives** : Elles se manifestent par une rougeur soudaine et une sensation de chaleur, principalement au niveau du cou et du visage. Les bouffées congestives peuvent être causées par la chaleur, un effort physique, une émotion, l'alcool, une hyperthyroïdie, un médicament, une tumeur du pancréas ou la ménopause

Références bibliographiques

A

Arnal-Schnebelen, B., Goetz, P. 2007. À propos de quatre plantes sédatives dans le traitement du stress féminin. *Phytotherapie*, 5(2) : 76-82.

Avril, J.L., Dabernat, H., Denis, F., Monteil, H. 1992. Bactériologie clinique, (2^{ème} éd) Ellipses Edition Marketing S.A. Paris. Pp : 10-196.

Aymonin, G.G. 1993. Guide des arbres et des arbustes. Sélection du reader's Digest(Ed), Paris, p : 351.

B

Balentine, C. W., Crandall, P. G., O'Bryan, C. A., Duong, D. Q., Pohlman, F. W. 2006. The pre-and post-grinding application of rosemary and its effects on lipid oxidation and color during storage of ground beef. *Meat science*, 73(3) : 413-421.

Basli, A., Chibane, M., Madani, K., Oukil, N. 2012. Activité antibactérienne des polyphénols extraits d'une plante médicinale de la flore d'Algérie : *Origanum glandulosum* Desf. *Phytothérapie*, 10:2-9

Belkhir, M., Rebai, O., Dhaouadi, K., Congiu, F., Tuberoso, C. I. G., Amri, M., Fattouch, S. 2013. Comparative analysis of Tunisian wild *Crataegus azarolus* (yellow azarole) and *Crataegus monogyna* (red azarole) leaf, fruit, and traditionally derived syrup: Phenolic profiles and antioxidant and antimicrobial activities of the aqueous-acetone extracts. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(40): 9594-9601.

Biyiti, L. F., Meko'o, D. J. L., Tamzic, V., Amvam Zollo, P. H. 2004. Recherche de l'activité antibactérienne de quatre plantes médicinales camerounaises. *Pharm. Med. Trad. Afr*, 13 : 11-20.

Boizot, N., Charpentier, J. P. 2006. Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Le Cahier des Techniques de l'INRA, Numéro spécial 2006: Méthodes et outils pour l'observation et l'évaluation des milieux forestiers, prairiaux et aquatiques*, 79-82.

Bonnet, R., Caron, F., Cavallo, J., Chardon, H., Chidiac, C., Courvalin, P., Lambert, T. 2013. Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie. *In Recommandations*.

Bouزيد, W., Yahia, M., Abdeddaim, M., Aberkane, M.C., Ayachi, A. 2011. Evaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits de L'Aubepine Monogyne. *Lebanese, Science Journal*, 12 (1) :59-69.

Burnichon, N., Texier, A. 2003. L'antibiogramme: la détermination des sensibilités aux antibiotiques. *DES Bactériologie, Semestre été 2003* :1-29.

C

Carbonelle, B., Denis, F., Marmonier, A., Pinon, G., Varguas, R. 1987. Bactériologies médicales : techniques usuelles. Edition SIMEP (2^{ème} tirage), France.

Cavallo, J.D., Plesiat, P., Couetdic, G., Leblanc, F., Fabre, R. 2002. Mechanisms of β -lactam resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: prevalence of OprM-overproducing strains in a French multicentre study (1997). *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 50 (6): 1039-1043.

Chebaibi, A., Filali, F. R., Amine, A., Zerhouni, M. 2011. Effet bactéricide (in vitro) des extraits aqueux des feuilles du grenadier marocain (*Punica granatum L*) sur des bactéries multirésistantes aux antibiotiques. *Phytothérapie*, 9(3) : 158-159.

Courvalin, P., Flandrois, J.P., Goldstein, F., Philippon, A., Sirot, J. 1988. L'antibiogramme automatisé mpc-vigt, Paris.

D

Decré, D. 2012. *Acinetobacter baumannii* et résistance aux antibiotiques: Un modèle d'adaptation. *Revue Francophone des Laboratoires*, (441) : 43-52.

Delarras, C. 2007. Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. Tec & doc/Lavoisier. Pp : 128-150.

Denis, F., Marie-cécile ploy, M.C., Martin, C., Bingen, E., Quentin, R. 2007. Bactériologie médicale techniques usuelles, (2^{ème} éd), Elsevier Masson Paris. Pp : 22.24.25.311

De Rijke, E., Out, P., Niessen, W.M.A., Ariese, F., Gooijer, C., Brinkman, U.A.Th. 2006. Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography*, A 1112 :31-63.

Dessouroux, A., Seyrig, C., Leclerc, C. 2011. Point sur la qualité des extraits fluides glycélinés de plantes fraîches standardisés (EPS) et leur intérêt pharmacologique. *Phytothérapie*, 9(4) : 249-250.

Doit, C., Mariani-Kurkdjian, P., Bingen, E. 2010. Entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu. *Archives de pédiatrie*, 17, S140-S144.

Drissa, D., Rokia, S., Hansétou, Y., Aminata, T., Kassoum, C., Ababacar, M. 2004. Etude des constituants des feuilles de *Ziziphus mauritania Lam (Rhamnaceae)*, utilisées traditionnellement dans le traitement du diabète au Mali. *C.R chimie*, 7 : 1073-1080.

Duval, J., Soussy, C.G. 1990. Antibiothérapie : bases bactériologiques pour l'utilisation des antibiotiques. Masson, Pp : 75-79-89-119.

F

Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Abdelly, C. 2008. Phenolic composition of *Cynara cardunculus L.* organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*, 331(5), 372-379.

Fauchère, J.L., Avril, J.L. 2002. Bactériologie générale et médicale. Ellipses Edition Marketing S.A. Paris. Pp: 141,239.

Ferrazzini, D., Monteleone, I., Belletti, P. 2008. Small-scale genetic diversity in oneseed hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq). *European Journal of Forest Research*, 127(5): 407-414.

G

Gundogdu, M., Ozrenk, k., Ercisl, S, Kan, T., Koda, O., Hegedus, A. 2014. Organic acids, sugars, vitamin C content and some pomological characteristics of eleven hawthorn species (*Crataegus spp*) from Turkey. *Biological Research*, 47:21, p: 4.

H

Herrera, C. M. 1984. Seed dispersal and fitness determinants in wild rose: combined effects of hawthorn, birds, mice, and browsing ungulates. *Oecologia*, 63(3), 386-393.

I

Iserin, P., Masson, M., Restellini, J. P. 2001. Larousse encyclopédie des plantes médicinales: identification, préparations, soins. Larousse, Paris. Pp : 302.

J

Joly, B., Reynaud, A. 2003. Entérobactéries : systématiques et méthodes d'analyses. Edition Technique et documentation, Paris, Pp : 28, 31.

K

Kipnis, É., Guery, B. P. 2010. Réévaluation de la colistine. *Antibiotiques*, 12(4), 205-227.

Kouatchet, A., Eveillard, M. 2012. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the intensive care unit. *Réanimation*, 21:493-505, Pp: 1.

L

Lalouette, J.A., Bachraz, D.Y., Sukurdeep, N., Seebaluck, BD eds. 1998. Proceedings of the Second Annual Meeting of Agricultural Scientists, Réduit, Mauritius, 12 - 13 August 1997. Réduit, Mauritius : *Food and Agricultural Research Council*, pp :83,84.

Lavigne, J.P., Sotto, A., Merle, C., Jourdan, J., Soussy, C.J., Sirot, D. 2002. Résistance enzymatique d'*Escherichia coli* aux B-Lactamines et prévalence en clinique. *Pathologie Biologie*, 50 :388-93.

Lucet, J.C., Andremont, A., Coignard, B. 2008. Les entérocoques résistants aux glycopeptides (ERG): situation épidémiologique, mesures de contrôle actuelles et enjeux à venir. *Bull Epidemiol Hebd*, 41-42 :386-389.

M

Marchal, N., Bourdon, J.L., Richard, CL. 1991. Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. (3^{ème} éd). Doin éditeurs, Paris.

Mazzochi, M. J., Dalioche, G., Frenol, U. 1999. Glaner dans le midi. Tetrass (Ed). Paris, p : 169.

Mebirouk-boudechiche, L., Cherif, M., Boudechiche, L., Sammar, F. 2014. Teneurs en composés primaires et secondaires des feuilles d'arbustes fourragers de la région humide d'Algérie, *Revue Méditerranéenne Vétérinaire*, 165,11-12,344-352, p : 350.

Mehani, M., Segni, L. 2014. Effet antimicrobien des huiles essentielles de la plante *Eucalyptus camadulensis* sur certaines bactéries pathogènes. *Proteus, Annales des Sciences et Technologie* Vol. 6, N° 1, 10(11), 66.

Mérens, A., Servonnet, A. 2010. Mécanismes et épidémiologie de la résistance aux fluoroquinolones en 2010. La résistance aux anti-infectieux. *Revue francophone des laboratoires*. 422 : 33-41.

Messaili, B. 1995. Botanique, systématique des spermaphytes. OPU (Ed). Alger, p : 91.

Mraihi, F., Hidalgo, M., De Pascual-Teresa, S., Trabelsi-Ayadi, M., Chérif, J.K. 2015. Wild grown red and yellow hawthorn fruits from Tunisia as source of antioxidants, *Arabian Journal of Chemistry*, 570-578, p :571-577.

N

Nabavi, S. F., Habtemariam, S., Ahmed. T., Sureda, A., Daglia. M., Sobarzo-Sánchez, E., Nabavi. S. M., 2015. Polyphenolic Composition of *Crataegus monogyna* Jacq.: From Chemistry to Medical Applications. *Nutrients*, 7(9), p: 7708-7728.

Naczki, M., Shahidi, F. 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography*, A 1054, 95–111.

Nauciel, C., Vildé, J.L., 2005. Bactériologie médicale, 2^{ème} édition, Masson pp : 49.

Nicolas-Chanoine, M.H., 2012. Les entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi: où sont les dangers?, *Réanimation*, 21(3), 260-267.

P

Pitout, J.D., Hanson, N.D., Church, D.L., Laupland, K.B. 2004. Population-based laboratory surveillance for *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactamases: importance of community isolates with blaCTX-M Genes. *Clinical Infectious Diseases*, 38(12), p: 1736-1741.

Prescott, L.M., Harley, J. P., Klein, D.A., Bacq-Calberg, C.M., Dusart, J. 2003. Microbiologie. (2^{ème} éd). De Boeck Université, Bruxelles, 1164.p :27.

R

Rahal, K. 2003. Standardisation de l'Antibiogramme en Médecine Humaine à l'Echelle Nationale Selon les recommandations de l'OMS. (4^{ème} éd), p : 7.

Roy, P.H. 1997. Dissémination de la résistance aux antibiotiques : le génie génétique à l'oeuvre chez les bactéries, *médecine/sciences* ; 13 : 927-33.

S

Sarker, S.D., Latif, Z., Gray, A. I. 2005. *Natural products isolation* (Vol. 20). Springer Science & Business Media. pp:1-23.

Schaechter, M., Medoff, G., Eisenstein, B. I. 1999. *Microbiologie et pathologie infectieuse*. De Boeck Supérieur. pp : 187-189.

SFM Antibiogram Committee. 2003. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie Report 2003 1, 2. *International journal of antimicrobial agents*, 21(4), pp :364-391.

Soussy, C.J. 2003. État actuel de la sensibilité de *Streptococcus pneumoniae* aux fluoroquinolones en France et dans le monde, *Médecine et maladies infectieuses*, 33(3), 125-126.

Soussy, C.J. 2007. Résistance bactérienne aux antibiotiques. *Monographies en urologie*. pp: 21-46.

T

Tenover, F.C. 2006. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *The American journal of medicine*, 119(6):S3-S10.

V

Vaubourdolle, M. 2007. *infectiologie*, (3^{ème} éd), Wolters Kluwer France. pp : 345 .

Vora, S., Auckenthaler, R. 2009. Que signifie «bêtalactamases à spectre élargi» en pratique?, *Rev Med Suisse*, 5 : 1991-4.

Y

Yala, D., Merad, A.S., Mohamedi, D., Ouar Korich, M.N. 2001. Classification et mode d'action des antibiotiques. *Médecine du Maghreb*, 91.Pp :14

Yamashita, S.K., Louie, M., Simor, A.E., Rachlis, A. 2000. Microbiological surveillance and parenteral antibiotic use in a critical care unit. *The Canadian Journal of Infectious Diseases*, 11(2): 107-111

Résumé :

Le but de cette étude consiste à l'évaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique de fruit de *Crataegus monogyna*, via la mesure du diamètre d'inhibition par la méthode de diffusion sur milieu solide et détermination de la concentration minimale inhibitrice.

Pour cela, trois souches de référence furent utilisées, en plus de sept souches résistantes aux antibiotiques Gram positif et Gram négatif. L'évaluation de l'activité antibactérienne a révélé la présence d'un faible effet antibactérien à la fois sur Gram (+) et Gram (-). L'activité la plus importante a été enregistrée avec *Klebsiella pneumoniae* avec un diamètre de la zone d'inhibition d'environ 13 ± 1.41 mm et une CMI de l'ordre de 12.5 µg/ml, alors que les autres souches ont montré une légère sensibilité vis-à-vis de l'extrait testé.

Mots clés : *Crataegus monogyna*, Bactéries résistantes, Antibiotique, Activité antibactérienne, Concentration Minimale Inhibitrice.

Abstract:

The aim of this study is to evaluate the antibacterial activity of the methanolic extract of the fruit *Crataegus monogyna*, by measuring the inhibition diameter using disk diffusion on solid medium technique and determination of the minimum inhibitory concentration.

For that, the test was performed on three bacterial references strains, and seven antibiotic resistant bacteria Gram negative and Gram positive. The evaluation of the antibacterial activity showed a low antibacterial effect in both Gram (+) and Gram (-). The highest activity was recorded against *Klebsiella pneumoniae*, the inhibition diameter's zone is around 13 ± 1.41 mm and MIC with 12.5 µg/ml, whereas the other strains are showing a weak sensitivity with the tested extract.

Key words: *Crataegus monogyna*, Resistant bacteria, Antibiotic, Antibacterial activity, Minimum Inhibitory Concentration.

المخلص:

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم النشاط المضاد للبكتيريا للمستخلص الميثانولي لفاكهة الزعرور الأحمر (*Crataegus monogyna*)، عن طريق قياس قطر التثبيط باستعمال طريقة الإنتشار على الوسط الصلب وتحديد أصغر تركيز مثبط.

وقد أجريت التجربة على ثلاث سلالات بكتيرية مرجعية وسبع سلالات بكتيرية مقاومة للمضادات الحيوية سالبة الجرام وموجبة الجرام حيث أعطى تقييم النشاط المضاد للبكتيريا فعالية منخفضة عند كل من سالبة الجرام وموجبة الجرام. وقد تم تسجيل أعلى نشاط ضد *Klebsiella pneumoniae*، حيث بلغ قطر التثبيط حوالي 13 ± 1.41 في حين أصغر تركيز مثبط كان 12.5 ميكروغرام/مل، أما باقي السلالات فقد أظهرت حساسية ضعيفة للمستخلص المدروس.

الكلمات المفتاحية:

الزعرور الأحمر، بكتيريا مقاومة، مضادات حيوية، النشاط المضاد للبكتيريا، أصغر تركيز مثبط.