

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
كلية علوم الطبيعة و الحياة
المكتبة
رقم الجرد : 23.74

جامعة محمد الصديق بن يحيى - جيجل -

Université Mohammed Seddik Ben Yahia - JIJEL -

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département : Microbiologie Appliquée et

Sciences Alimentaires



كلية علوم الطبيعة و الحياة

قسم : ميكروبيولوجيا تطبيقية و علوم التغذية

Mémoire de fin d'études

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

Option : Microorganismes et Pathogénicité

Thème

**Identification des bactéries responsables des infections
urinaires et activité antibactérienne des extraits de**

Punica granatum

Membres de Jury :

Présidente : M^{elle} AYAD R.

Encadreur : Dr. AKROUM S.

Examinatrice : Dr. LAGGOUNE S.

Présenté par :

- M^{elle} BOUDERBALA Souad

- M^{elle} KHELALAF Hind

Année Universitaire 2015 - 2016

Numéro d'ordre (bibliothèque) :

Dedicaces

Dédicaces

Je dédie ce travail

*A mes parents ; qu'ils trouvent ici toute
ma gratitude pour leur soutien tout au
long de mes études*

A la mémoire de ma grand-Mère

A mes frères et mes sœurs

*A mes très chères amies : Hasna, Hind,
Amel et Chahela*

*A toute ma famille paternelle et
maternelle*

A tous ceux qui me sont chers

BOUDERBALA Souad

Dédicace

Je dédie ce travail

A mes très chers parents et ma grande mère, pour les encouragements, la tendresse, l'amour et le soutien qu'ils m'ont procurée durant mes études, je souhaite avoir réalisé l'un de vos rêves par ce modeste travail. Puisse ALLAH vous accorder une longue vie pleine de santé et de bonheur.

A mes chères sœurs : Anissa et Nadjwa pour leur amour et compréhension.

A mon frère pour son encouragement et son soutien constant.

A toute ma famille paternelle et maternelle

A tous mes collègues et amis(es).

KHELALAF Hind

Remerciements

Sommaire

Introduction générale	1
<u>Synthèse bibliographique</u>	3
Chapitre I : Les infections urinaires et bactéries responsables	3
I-1. Définition des urines	3
I-2. Définition de l'infection urinaire.....	3
I-3. Les modes d'infection de l'appareil urinaire.....	4
I-4. Les germes en causes.....	4
I-4-1. Les bactéries à Gram négatif.....	4
I-4-2. Les bactéries à Gram positif.....	6
I-5. Facteurs favorisant de l'infection urinaire.....	7
I-5-1. Facteurs liés à la bactérie.....	7
I-5-2. Facteurs intrinsèques.....	7
I-5-3. Facteurs extrinsèques.....	8
Chapitre II : Présentation de <i>Punica granatum</i> et ses intérêts	9
II-1. Définition.....	9
II-2. Principes actifs présents chez <i>Punica granatum</i>	10
II-3. Propriétés thérapeutiques des grenades (<i>Punica granatum</i>).....	11
II-3-1. Propriétés antioxydantes de la grenade.....	11
II-3-2. Action anticancéreuse.....	11
II-3-3. Action préventive des maladies cardiovasculaire.....	12
II-3-4. Activité antimicrobienne.....	12
<u>Partie pratique</u>	14
Matériels et méthodes	14
I. Matériels	14
I-1. Instruments et appareillages.....	14
I-2. Colorants et solutions.....	15
I-3. Milieux de culture.....	15
II. Méthodes	16
II-1. Récupération des échantillons.....	16
II-2. Ensemencement sur les milieux sélectifs.....	16

II-3. Récupération des bactéries déjà identifiées.....	18
II-4. Vérification de la pureté des espèces.....	18
II-5. Préparation des extraits bruts de <i>Punica granatum</i>	18
II-6. Test de l'activité antibactérienne des extraits.....	19
II-7. Test de l'activité antibactérienne des antibiotiques.....	20
III-Résultats.....	21
III-1. Résultats des prélèvements d'urine.....	21
III-2. Caractérisation des colonies apparues sur les milieux sélectifs.....	21
III-2-1. Sur le milieu EMB	22
III-2-2. Sur le milieu BEA.....	24
III-2-3. Sur le milieu Mac Conkey.....	26
III-2-4. Sur le milieu Hektoen.....	27
III-2-5. Sur le milieu Chapman.....	29
III-3. Confirmation de la pureté des espèces apportées des laboratoires.....	30
III-4. Résultats de l'activité antibactérienne des extraits bruts.....	33
III-5. Résultats de l'activité antibactérienne des antibiotiques.....	39
IV. Discussion.....	41
Conclusion	45
Références bibliographiques.....	46

Introduction

Introduction Général

Les urines sont en temps normal liquides et ne contiennent que les déchets organiques ou minéraux éliminés par les reins. Néanmoins dans certains cas, elles peuvent contenir des bactéries et provoquer des infections gênantes voire douloureuses pour l'être humain. Ces infections sont qualifiées d'infections urinaires. Elles se caractérisent principalement par des brûlures lors des mictions et une fréquente envie d'uriner. Dans certains cas elles s'accompagnent par des douleurs abdominales et de la fièvre.

Selon la localisation de l'infection, nous pouvons distinguer trois formes : la première est « la cystite infectieuse » qui est une inflammation de la vessie. Elle est le plus souvent provoquée par la prolifération de bactéries intestinales. Cette forme est de loin la plus courante et touche presque uniquement les femmes. La deuxième forme est qualifiée de « urétrite infectieuse » ; elle est localisée uniquement au niveau de l'urètre (le conduit qui relie la vessie au méat urinaire). Cette forme est sexuellement transmissible et touche principalement les hommes. La troisième forme est « la pyélonéphrite » qui est une affection plus grave. Elle désigne l'inflammation du bassinet (la cavité du rein collectant les urines) et du rein lui-même (Hooton, 2012).

Le système urinaire possède de nombreux moyens de défense contre les infections, comme le flux urinaire expulse les bactéries et rend plus difficile leur ascension vers la vessie et les reins, l'acidité de l'urine qui inhibe la croissance des bactéries, la surface très lisse de l'urètre rend difficile la remontée des bactéries, la forme des uretères et de la vessie prévient la remontée de l'urine vers les reins, la paroi de la vessie qui contient des cellules immunitaires ainsi que des substances antibactériennes et chez les hommes, les sécrétions de la prostate qui contiennent des substances qui ralentissent la multiplication des bactéries dans l'urètre (Barrier, 2014).

Mais tous ces points sont insuffisants pour protéger le système urinaire. Les causes des infections urinaires sont diverses et nombreuses. Elles peuvent être dues à l'anatomie elle-même comme la proximité de l'anus de l'appareil urinaire, à la présence qu'une maladie qui rend les sujets prédisposés, principalement le diabète et l'insuffisance rénale ou à une manipulation médicale comme l'endoscopie. Les statistiques montrent néanmoins que deux facteurs sont incontournables : l'âge et le sexe. En effet, les personnes âgées sont plus exposées à l'infection que les jeunes personnes et les femmes plus sujettes que les hommes (Laville et Xavier, 2003).

Escherichia coli est la première espèce rencontrée en cas d'infections urinaires. Mais plusieurs autres bactéries peuvent causer ces infections et ce au niveau des différentes parties de l'arbre urinaire. Parmi elles, nous avons *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Morganella morganii*, *Providencia rettgeri*, *Providencia stuartii*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*,

Enterobacter cloacae, *Citrobacter freundii* et *citrobacter koseri* et *Pseudomonas aeruginosa*. Les bactéries à Gram positif sont moins nombreuses mais sont néanmoins en cause, les principales espèces étant *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus saprophyticus* et *Staphylococcus aureus* (Hooton, 2012).

Le traitement courant des infections urinaires est basé sur l'utilisation des antibiotiques, principalement l'amoxicilline, la nitrofurantoïne, le sulfaméthoxazole associé au triméthoprim et le triméthoprim. Le choix de l'antibiotique se fait au hasard au départ, puis en fonction des résultats de l'analyse d'urine (Nicolle et *al.*, 2006).

Bien que les infections urinaires soient des infections banales et faciles à soigner, certains cas peuvent évoluer vers des formes beaucoup plus compliquées. De plus un traitement ordinaire peut simuler une guérison sans que les processus lésionnels soient réellement guéris. Ils peuvent alors évoluer progressivement. Lorsque l'atteinte est bilatérale, de véritables fontes purulentes des reins sont d'une gravité telle que l'ablation des deux reins est parfois nécessaire pour sauver la vie des patients. Ces complications désastreuses sont aussi observées chez les porteurs de calculs des voies excrétrices qui bloquent l'écoulement des urines infectées. Les obstructions urinaires avec infection sus-jacente constituent de véritables urgences médico-chirurgicales.

L'un des autres problèmes qui peuvent aggraver la guérison est l'apparition des résistances bactériennes lors de ces infections, surtout quand il s'agit de germes nosocomiaux contractés lors d'une hospitalisation ou d'une mauvaise assiduité lors de la prise des antibiotiques (Petrolini et *al.*, 2013).

Afin de contrer ce problème, les recherches se sont orientées vers la médecine traditionnelle. En effet, les herbes et les plantes médicinales sont de plus en plus étudiées dans le but de découvrir des extraits ou des composés végétaux suffisamment efficaces pour remplacer les antibiotiques. Après l'ail et l'oignon qui ont montré de bons résultats, les chercheurs ont annoncé que le persil était la meilleure herbe en cas d'infection des voies urinaires. La tisane de cette herbe s'est avérée très riche molécules actives contre les bactéries responsables et est actuellement préconisée comme traitement de choix en médecine traditionnelle comme en médecine clinique (Petrolini et *al.*, 2013).

Toujours dans l'optique de trouver des plantes efficaces, nous proposons dans ce travail l'étude du fruit de *Punica granatum*, communément appelé la grenade. Ce fruit est couramment utilisé pour le traitement du tube digestif car il est très riche en composés secondaires bioactifs, mais son utilisation en cas d'infection urinaire demeure inconnue. Donc, nous préparons des extraits bruts en utilisant différents solvants, puis nous testons ces extraits sur des bactéries isolées à partir de patients atteints d'infection urinaires.

Synthèses bibliographiques

Synthèse Bibliographique

Chapitre I : Les infections urinaires et bactéries responsables

I-1. Définition des urines

L'urine est un liquide formé et secrété par les reins et éliminer par les voies urinaires qui constituent le principal véhicule d'élimination des déchets de l'organisme (Lacour, 2013).

L'urine est constituée d'eau, dans laquelle sont dissoutes des substances minérales (sodium, potassium, calcium, magnésium, chlorure, sulfates, phosphates) et organiques (urée, créatinine, acide urique, acides aminés, enzymes, hormones, vitamines). Elle peut aussi contenir une petite quantité des globules rouges et des globules blancs (moins de 5 000 par millilitre), par contre elle ne contient ni glucides, ni protéines, ni bactéries en temps normal (Wainsten, 2012). En cas d'infection urinaire, ce liquide devient peuplé de microorganismes, car il a une constitution idéale pour le développement microbien.

Chez les sujets normaux, les urines sont normalement stériles, elles peuvent être souillées lors de la miction par la flore commensale qui colonise l'urètre et la région périnéale (site 1).

I-2. Définition de l'infection urinaire

L'infection urinaire est due à une prolifération microbienne touchant n'importe quel point de l'appareil urinaire (vessie, rein, urètre, prostate). Elle est plus courante chez les femmes que chez les hommes, près de 35% des femmes ont eu au moins un épisode de cette infection dans leur existence.

L'infection urinaire est définie d'un point de vue biologique par la présence significative des bactéries dans l'urine (bactériurie d'au moins 10^5 germe/ml d'urine) accompagnée d'une leucocyturie pathologique supérieure ou égale à 10^4 /ml d'urine (Cavallo et Garrabé, 2003).

Cette infection est confirmée par l'examen cyto bactériologique des urines (ECBU) qui met en évidence la présence d'une leucocyturie et d'une bactériurie significatives (Cavallo et Garrabé, 2003).

I-3. Les modes d'infection de l'appareil urinaire

Les urines normalement stériles peuvent être infectées par deux voies : ascendante et hémotogène (Lacobelli et *al.*, 2009). Le mécanisme d'acquisition des infections urinaires est principalement ascendant. L'urètre est parfois colonisé par les germes de la flore vulvo-périnéale et intestinale. Au cours d'une infection urinaire, les bactéries remontent les voies urinaires par l'urètre jusqu'à la vessie en adhérant à l'épithélium ou elles se multiplient, elles peuvent alors détruire l'épithélium et y pénétrer à l'intérieur entraînant une réponse inflammatoire. Dans les cas les plus graves, les bactéries envahissent les reins et chez l'homme la prostate (Caron, 2003)

Dans de rares cas, les infections urinaires peuvent être acquises par voie hémotogène résultent de la dissémination dans tout l'organisme par un germe provenant d'un foyer infectieux, causant dans un premier temps une septicémie puis la colonisation de tous les tissus y compris l'appareil urinaire (Caron, 2003).

I-4. Les germes en causes

I-4-1. Les Bactéries à Gram négatif :

Escherichia coli : Est un bacille à Gram négatif, mobile, appartient à la famille des Entérobactéries (Wainsten, 2012). Il est indole positif, lactose positif et VP négatif.

Cette bactérie est un saprophyte du côlon, son passage dans l'appareil urinaire est la principale cause de l'infection causée par ce germe (Seck, 2005).

Proteus-Morganella-Providencia : Ces Entérobactéries comprennent des espèces qui ont toutes les enzymes « désaminases » ce qui constitue donc un test idéal pour leur identification. Les principales espèces rencontrées lors des infections urinaires sont (Avril et *al.*, 2000) :

- *Proteus mirabilis* et *Proteus vulgaris*
- *Morganella morganii*
- *Providencia rettgeri*, *Providencia stuartii* et *Providencia alcalifaciens*

Les genres *Proteus*, *Morganella*, *Providencia* sont très répandus dans la nature. Elles sont des commensaux du tube digestif de l'homme et des animaux. Ils sont souvent responsables d'infections urinaires (Avril et *al.*, 2000).

Proteus mirabilis est l'espèce la plus fréquente, après *Escherichia coli* elle est la bactérie la plus souvent isolée des urines. En plus des « désaminases » cette espèce possède une uréase très active (Avril et al., 2000), l'uréase est un enzyme qui hydrolyse l'urée, ce qui conduit à une augmentation des concentrations en ammoniums, phosphates et carbonates et à urine alcaline. Ce pH élevé prédispose le patient à la formation de calculs urinaires (urolithiases) (Bruyere et al. 2008, Armbruster et al. 2014).

Serratia marcescens : Est une espèce du genre *Serratia* qui fait partie de la famille des Entérobactéries. C'est un bacille à Gram négatif, mobile et ubiquitaire. Parmi les espèces du genre *Serratia*, *S.marcescens* est la seule à jouer un rôle important comme pathogène opportuniste.

Contrairement à d'autres Entérobactéries, les souches de *Serratia* produisent habituellement désoxyribonucléase extracellulaire (DNase), et sont résistants aux antibiotiques Colistine et la céphalothine (Avril et al., 2000).

Cette bactérie est responsable des infections urinaires nosocomiales surtout chez les malades opérés ou sondés (Avril et al., 2000).

Klebsiella pneumoniae: Aussi appelée bacille de Freidlander (Wainsten, 2012).

C'est un bacille à Gram négatif, immobile, capsulé qui fait partie de la famille des Entérobactéries. Il est indole négatif, uréase positive, VP positif et ONPG positif. *Klebsiella pneumoniae* est à la fois une bactérie commensale de l'organisme, et un agent pathogène responsable d'infections variées (infection broncho-pulmonaires, septicémies et des méningites).

Klebsiella pneumoniae est connue pour causer des infections urinaires. Moins fréquemment, l'espèce *Klebsiella oxytoca* peut aussi causer ce genre d'infections (Jean et al., 2016).

Enterobacter cloacae* et *Enterobacter aerogenes : Bacilles à Gram négatif, appartiennent à la famille des Entérobactéries, elles se distinguent des *Klebsiella* par leurs mobilités, par la présence d'une ODC et l'absence d'uréase (Avril et al., 2000).

Ces espèces présentes dans l'environnement, sont également des commensaux du tube digestif de l'homme et des animaux. Ce sont des pathogènes opportunistes responsables en milieu hospitalier d'infections urinaires, aussi de bactériémies et de méningites. (Avril et al. 2000, Anne et Pagés 2015).

Citrobacter freundii* et *Citrobacter koseri : Bacilles à Gram négatif, mobile appartiennent à la famille des Entérobactéries. Ce sont des bactéries présentes dans l'environnement et des hôtes normaux du tube digestif. Le plus souvent elles sont **pathogène opportunistes**, responsables d'infections nosocomiales à l'hôpital (Avril et *al.*, 2000).

Ces espèces sont caractérisées par la présence d'une β -galactosidase et l'utilisation de citrate de Simons comme seule source de carbone.

Pseudomonas aeruginosa: Autrement connu sous le nom de bacille pyocyanique. C'est une bactérie à Gram négatif, mobile, oxydase positif. Elle appartient à la famille des Pseudomonadaceae. C'est l'espèce type du genre *Pseudomonas* et a les caractéristiques suivantes :

- protéolytique
- production de deux pigments : la pyocyanine (pigment bleu) qui est spécifique de *Pseudomonas aeruginosa* et la pyoverdine (pigment jaune-vert), dite aussi fluorescéine, qui est présente chez d'autres *Pseudomonas*.

Cette bactérie très répandue dans la nature, et peut vivre en commensale dans le tube digestif de l'homme. Elle est caractérisée par sa résistance aux antibiotiques et aux antiseptiques surtout en milieu hospitalier. Elle représente le germe type des infections nosocomiales (Wainsten, 2012).

En plus des infections urinaires, cette espèce peut aussi causer des pneumonies (Mesaros et *al.*, 2007).

I-4-2. Bactéries à Gram positif :

Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium : Sont des cocci à Gram positif, sphérique ou ovoïde, catalase négatif et oxydase négatif (Avril et *al.*, 2000).

E. faecalis et *E. faecium* font partie de la flore normale du tractus gastro-intestinal, des voies génitales féminines et dans une moindre mesure de la cavité orale (site 2). Néanmoins, ce sont des pathogènes opportunistes et sont responsables d'infections urinaires, d'infections abdominales d'origine intestinale et de septicémies.

***Staphylococcus saprophyticus* et *Staphylococcus aureus*:** Ces espèces appartiennent à la famille des Micrococcaceae. Ce sont des coques Gram positif ayant un aspect en grappe au microscope optique (Franklin et Lowy, 1998).

Staphylococcus aureus se distingue des autres espèces de Staphylocoques par ses colonies dorées, les résultats positifs de la coagulase, la présence d'une désoxyribonucléase (DNASE) et la fermentation de mannitol (Franklin et Lowy, 1998).

Staphylococcus saprophyticus est une bactérie opportuniste potentiellement pathogène responsable de 5 à 10% des infections urinaires chez la femme en raison de son aptitude à adhérer à l'épithélium urinaire (Avril et al., 2000).

I-5. Facteurs favorisant de l'infection urinaire

La pathogenèse des infections urinaires s'explique par différents facteurs. Les plus importants sont :

I-5-1. Facteurs liés à la bactérie

Certaines souches sont plus virulentes que d'autres car elles adhèrent plus fortement à la muqueuse urothéliale, les structures qui président à cette adhésion sont les *pili* ou *fimbriae*. Les cellules épithéliales urinaires de l'hôte possèdent un nombre accru de récepteurs qui facilitent l'adhérence des germes (Lacobelli et al. 2009).

L'antigène K est exprimé sur la capsule bactérienne, il protège la bactérie de la phagocytose. C'est un facteur de virulence important car il s'oppose ainsi aux processus de défense de l'organisme (Chafai, 2008).

Les LPS bactériens jouent le rôle d'endotoxine qui explique les réactions systémiques accompagnant l'infection à colibacille (fièvre, leucocytose) (Chafai, 2008).

I-5-2. Facteurs intrinsèques

Le sexe : le risque de développer une infection urinaire est plus élevée chez la femme que chez les hommes pour des raisons anatomiques. En effet, l'urètre féminin est plus court que l'urètre masculin d'où sa rapidité de surcharge par l'agent infectieux (Chafai, 2008).

L'Age : l'infection urinaire nosocomiale serait plus fréquente chez les personnes âgées.

Le diabète : en cas de diabète, une partie du sucre présent dans le sang va être évacué par les reins. L'urine va contenir du sucre qui va favoriser la prolifération des bactéries (Chafai, 2008).

Les patients ayant une cardiopathie, une insuffisance rénale ou une hypertension artérielle.

I-5-3. Facteurs extrinsèques

L'infection lors d'un sondage urinaire. Cette infection est due au placement d'une sonde avec un non-respect des mesures d'hygiène et d'asepsie. Le sondage est responsable de 80% des infections urinaires nosocomiales d'origine extrinsèque et le risque augmente de 5 à 10% par jour de sondage (Barrier, 2014).

Les gestes thérapeutiques appliqués sur les voies urinaires. Principalement l'endoscopie et chirurgie urologique.

Chapitre 2 : Présentation de *Punica granatum* et ses intérêts

II-1. Définition

Punica granatum (le grenadier) est une espèce qui appartient à la famille des Punicaceae, division Magnoliophyta, classe Magnoliopsida et ordre des Myrtales. Cet arbre est un arbre fruitier ou arbuste buissonnant de 2 à 5m de hauteur, légèrement épineux, au feuillage caduc et au tronc tortueux, les fleurs sont blanches ou rouges vif mesurent 3cm de diamètre. Il croît majoritairement dans toute la région méditerranéenne, de façon spontanée ou cultivée (Evreinoff 1957, Moorthy et al., 2013), actuellement, la grenade est cultivée dans la plupart des régions à climat chaud, car il a besoin de fortes chaleurs pendant toute la période de fructification (Sarkhosh, 2005).



Figure1: Un grenadier en fruits
(site2).

Classification classique :

Règne : Plantae

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Ordre : Myrtales

Famille : Punicaceae

Genre : *Punica*

Espèce : *Punica granatum*

Classification phylogénétique :

Ordre : Myrtales

Famille : Lythraceae

Pendant des siècles, les écorces, les feuilles, les fleurs, les fruits et les graines de cette plante ont été utilisées pour traiter plusieurs maladies ce qui fait d'elle une espèce médicinale (Evreinoff 1957, Moorthy et al., 2013).

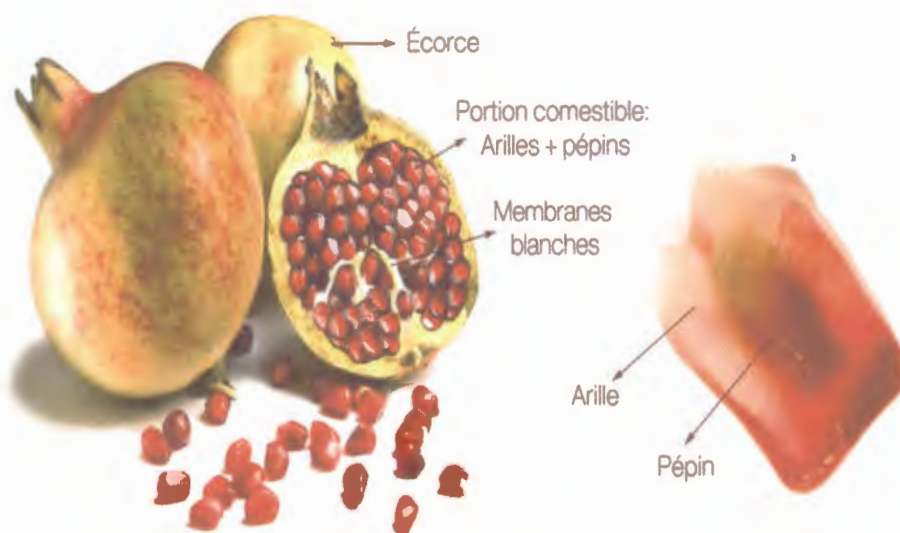


Figure2 :Planche anatomique de la grenade, définition des différentes parties du fruit (site3).

II-2. Principes actifs présents chez *Punica granatum*

De nombreuses études menées sur *Punicagranatum* montrent que cette plante contient plusieurs composants bioactifs qui peuvent prévenir différents types de maladies.

- Une quantité importante d'anthocyanines, ce qui donne à la grenade sa couleur rouge, à savoir la delphinidine, la cyanidine et la pélargonidine qui sont trouvés dans le jus et l'écorce de la grenade (Dahham et al., 2010).
- Les acides phénols dérivés de l'acide benzoïque (acides hydroxybenzoïques) y compris l'acide gallique et l'acide ellagique qui sont retrouvés dans le jus et l'écorce (Dahham et al., 2010, Al-Muammar et Khan 2012), mais aussi dans l'extrait de feuilles et de fleurs (Al-Muammar et Khan, 2012).
- Les acides phénols dérivés de l'acide cinnamique (acides hydroxycinnamiques) notamment l'acide caféique, l'acide chlorogénique, et l'acide p-coumarique qui sont retrouvés dans le jus et l'écorce de grenade (Lansky et Newman, 2007).

- Les tannins hydrolysables HTs (ellagitaninis) tels que la punicaline, la punicalagine, la Pedunculagin, la granatine A et la granatine B qui se retrouvent dans l'écorce de grenade (Lansky et Newman, 2007). Tandis que les feuilles contiennent en plus de la punicaline, la punicafolin (Dahham et *al.*, 2010).
- Les flavonoides : à savoir les flavan-3-ols avec notamment le catéchine et l'épicatéchine et les flavonols avec notamment le kaempférol, quercétine, rutine retrouvés surtout dans la peau de fruit (Lansky et Newman, 2007).
- Les tannins condensés : les proanthocyanidines, ils sont très répandus dans l'écorce végétale (Dahham et *al.*, 2010).

II-3. Propriétés thérapeutiques des grenades (*Punicagranatum*)

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime que la médecine traditionnelle couvre les besoins en soins de santé primaires de 80% de la population des pays en voie de développement (El meskaoui et *al.*, 2008). Les découvertes scientifiques récentes corroborent l'utilisation traditionnelle de la grenade comme un remède médical et indique que les tissus du grenadier, du fruit, des fleurs, de l'écorce et des feuilles contiennent des composés phytochimiques bioactifs qui sont antimicrobiens, réduisent la pression artérielle et agissent contre des nombreuses maladies graves comme le diabète, le cancer, les infections urinaires et les infections du troubles digestifs (Anibal et *al.*, 2013, Lairini et *al.*, 2014).

II-3-1. Propriétés antioxydantes de la grenade : La grenade se caractérise par son pouvoir antioxydant qui est 3 à 4 fois supérieur à celui du vin rouge et du thé (Lansky et Newman 2007).

Les composés secondaires bioactif de *Punica granatum* ayant des propriétés antioxydantes très importantes. En effet, ils sont capables de piéger les radicaux libres, de donner une défense adéquate contre les attaques par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et d'activer les autres antioxydants présents dans le corps (Belkacem et *al.*, 2014).

II-3-2. Action anticancéreuse : La présence des antioxydants dans le grenadier notamment les composés bioactifs protègent contre les radicaux libres qui sont à l'origine de l'oxydation des cellules et causent un certain nombre de problèmes de santé (cancer du sein, prostate, et le cancer des poumons) (Bhowmik et *al.*, 2013).

Divers extraits de *Punica granatum* (jus, huile de graine, écorce) ont une action inhibitrice de la prolifération des cellules cancéreuses.

L'acide ellagique, l'acide caféique et l'acide punique sont des molécules présentes dans la grenade et démontant des activités anticancéreux connus et elles sont testées en tant qu'inhibiteurs de la croissance in vitro de cellules cancéreuses humaines de prostate (Lansky et al., 2005).

La quercétine et la catéchine sont considérés parmi les flavonoïdes les plus actifs sur les cellules tumorales. La quercétine inhibe en effet la prolifération des cellules cancéreuses et la catéchine, quant à elle, est un inhibiteur de certaines réactions d'oxydation donnant un ADN anormal (Usha et al., 2014).

II-3-3. Action préventive des maladies cardiovasculaires :

L'athérosclérose est de loin la première cause de mortalité au niveau mondial et est à l'origine de la plupart des maladies cardiovasculaires.

La consommation du jus de grenade, qui possède la plus forte concentration en composés secondaires bioactifs par-rapport au jus d'autres fruits, peut maintenir un bon écoulement du sang dans le corps, parallèlement à cela, il favorise la protection contre les altérations cardiaques et vasculaire. Au niveau des artères, ces molécules préviennent l'oxydation des lipoprotéines de faible Densité (LDL) évitant ainsi l'athérosclérose (Jurenka, 2008, Zarefeshany et al., 2014).

II-3-4. Activité antimicrobienne :

a. Activité antifongique :

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

L'activité antifongique est due à la présence des composés bioactifs notamment la punicalagine, ce dernier possède une forte activité contre *Candida albicans* et *Candida parapsilosis* (Teodoro et al., 2015).

b. Action antiparasitaire :

La grenade (fruit et l'écorce) est utilisée pour le traitement et la prophylaxie du Paludisme. En effet l'extrait méthanolique montre une inhibition de la croissance de *Plasmodium falciparum*. Cette activité est due à la présence des tanins, de la punicalagine et de l'acide gallique (Reddy et al., 2007).

c. Activité antivirale :

Les polyphénols de grenade à savoir l'acide ellagique, l'acide caféique et le punicalagin ont des propriétés antivirales contre le virus de la grippe A. Le punicalagin est le composant le plus efficace. Ces polyphénols sont capables de bloquer la réplication de l'ARN du virus et donc empêchent sa multiplication. En outre, ils améliorent l'effet des médicaments anti-grippaux (l'oséltamivir) pour le traitement et la prévention des gripes (Haidari et al., 2009).

d. Activité antibactérienne :

Punica granatum possède une activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens* et *Enterobacter aerogenes* (Prashanth et al., 2001, Dahham et al., 2010, Hajoori et al., 2014).

L'activité antibactérienne est due à la présence de certains composés bioactifs tels que les terpènes, les alcaloïdes, les huiles essentielles et les composés phénoliques (Moorthy et al., 2013, Lairini et al., 2014).

Partie pratique

Liste des abréviations

BEA : Bile –Esculine d'azide sodium

ECBU : l'examen cyto bactériologique des urines

EMB : Eosine Bleu de Méthylène

LDL : Low Density Lipoprotein

LPS : Lipopolysaccharides

Mm : millimètre

ODC: Ornithine Décarboxylase

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

ONPG: Ortho nitr-phényl-βD-Galactopyranosidase

ROS : Réactives de l'oxygène

V : Volume

VP : Voges Proskauer

Liste des tableaux

Tableau 1 : Présentation des patients donneurs d'urine	16
Tableau 2 : Résultats des colonies apparues sur les milieux sélectifs.....	21
Tableau 3 : Résultats de l'activité antibactérienne exprimés en mm	34

Liste des figures

Figure 1 : Un grenadier en fruits	9
Figure 2 : Planche anatomique de la grenade, définition des différentes parties du fruit....	10

Liste des schémas

Schéma 1 : Technique d'isolement des colonies responsables des infections urinaires.....	17
Schéma 2 : Protocole des préparations des extraits bruts de <i>Punica granatum</i>	19
Schéma 3 : Protocole di test de l'activité antibactérienne des extraits.....	20

Liste des photos

Photo 1 : Aspect de la souche 1 sur EMB	22
Photo 2 : Observation microscopique de la souche 1.....	22
Photo 3 : Aspect de la souche 2 sur EMB.....	22
Photo 4 : Aspect de la souche 3 sur EMB	23
Photo 5 : Observation microscopique de la souche 4.....	23
Photo 6 : Aspect de la souche 5 sur EMB.....	24
Photo 7 : Observation microscopique de la souche 5	24
Photo 8 : Aspect de la souche 6 sur BEA	25
Photo 9 : Aspect de la souche 7 sur BEA	25
Photo 10 : Observation microscopique de la souche 7.....	25
Photo 11 : Aspect de la souche 8 sur BEA	26
Photo 12 : Aspect de la souche 9 sur Mac Conkey.....	27
Photo 13 : Observation microscopique de la souche 9.....	27
Photo 14 : Aspect de la souche 10 sur Mac Conkey.....	27
Photo 15 : Observation microscopique de la souche 11	28
Photo 16 : Aspect de la souche 12 sur Hektoen.....	29
Photo 17 : Observation microscopique de la souche 12	29
Photo 18 : Observation microscopique de la souche 13	30
Photo 19 : Aspect de <i>Klebseilla pneumoniae</i> sur Hektoen	31
Photo 20 : Observation microscopique de <i>Staphylococcus aureus</i>	31
Photo 21 : Aspect d' <i>Escherichia coli</i> sur Hektoen	32
Photo 22 : Observation microscopique d' <i>Escherichia coli</i>	32
Photo 23 : Observation microscopique d' <i>Enterobacter cloacae</i>	32
Photo 24 : Observation microscopique de <i>Citrobacter koseri</i>	33
Photo 25 : Zones nettes aux bords irréguliers	35
Photo 26 : Zones nettes aux bords réguliers.....	35
Photo 27 : Types des zones d'inhibition.....	35
Photo 28 : Absence de l'activité antibactérienne des extraits sur <i>Citrobacter koseri</i> ...	36
Photo 29 : Absence de l'activité antibactérienne des extraits sur <i>Enterobacter cloacae</i>	36
Photo 30 : Absence de l'activité antibactérienne des extraits sur la souche 2	36
Photo 31 : Activité antibactérienne des extraits sur la souche 9.....	37
Photo 32 : Activité antibactérienne des extraits sur la souche 3.....	37

Photo 33 : Activité antibactérienne des extraits sur <i>Staphylococcus aureu</i>	38
Photo 34 : Activité antibactérienne des extraits sur la souche 5.....	38
Photo 35 : Activité antibactérienne de l'extrait acétonique sur la souche 4	38
Photo 36 : Activité antibactérienne des antibiotiques sur <i>Staphylococcus aureus</i>	39
Photo 37 : Activité antibactérienne des antibiotiques sur la souche 1.....	39
Photo 38 : Activité antibactérienne des antibiotiques sur <i>Citrobacter cloacae</i>	40

Sommaire

Partie pratique

Matériels et méthodes

I. Matériels

I-1. Instruments et appareillages :

- Boites Pétri
- Anse de platine
- Lames et lamelles
- Etuve
- Bec bunsen
- Microscope optique
- Pipettes Pasteur
- Bain-marie
- Tubes à essais
- Réfrigérateur
- Micropipettes
- Pipettes graduées
- Balance
- Agitateur magnétique
- Rotavapor
- Pince
- Autoclave
- Becher
- Entonnoir
- Flacon
- Disques d'antibiotiques : Imipenème
- Amoclan en poudre (sachets dose de 1g / 125 mg)
- L'Ampimex

- Ecouvillon

I-2. Colorants et solutions :

- Eau physiologie stérile
- Violet de gentiane
- Lugol
- Alcool
- Bleu de méthylène
- Fuchsine
- Huile à immersion
- Eau de Javel
- Eau distillée
- Méthanol
- Ethanol
- Acétone

I-3. Milieux de culture :

- Gélose nutritive
- Bouillon nutritif
- Gélose Chapman
- Gélose Hektoen
- Gélose Mac Conkey
- Gélose Baird Parker
- Gélose BEA
- Gélose EMB
- Gélose Mueller-Hinton

II. Méthodes

II-1. Récupération des échantillons :

Les échantillons d'urine sont fournis par le laboratoire de microbiologie de l'hôpital MOHAMMED SEDDIK BEN -YAHIA et par le laboratoire des analyses médicales BEKIOUA de JIJEL. Ils sont recueillis à partir de patients atteints d'infections urinaires (Tableau 1).

Tableau 1 : Présentation des patients donneurs d'urines.

Echantillon	Patients		Cause de consultation (en plus de l'infection urinaire)
	Age	Sexe	
1	23 ans	Homme	Aucune autre infection
2	61 ans	Femme	Diabète
3	38 ans	Homme	Diabète
4	39 ans	Femme	Grossesse
5	50 ans	Homme	Aucune autre infection
6	65 ans	Homme	Prostate
7	45 ans	Femme	Stase urinaire
8	6 mois	Femme	Aucune autre infection
9	40 ans	Femme	Diabète
10	30 ans	Femme	Trouble digestif

L'échantillon est ramené par le patient lui-même, il correspond au deuxième jet de la première mictée du matin recueilli dans un pot rempli en trois quarts (3/4) fermé hermétiquement et transporté au laboratoire dans les plus brefs délais (ne dépassant pas une heure de temps).

II-2. Ensemencement sur les milieux sélectifs :

Cette étape permet de recueillir sous forme de colonies bien distinctes les bactéries qui sont en cause de l'infection urinaire.

A proximité du bec bunsen et à l'aide d'une anse de platine chaque échantillon est ensemencé par stries (schéma 1) sur les milieux suivants :

- La gélose nutritive : ce milieu est utilisé pour recueillir tous les types de bactéries présents dans les échantillons d'urine et donc pour confirmer que l'urine est réellement infectée.
- EMB : ce milieu permet d'isoler les bactéries à Gram négatif (les Entérobactéries) responsables de la grande partie des infections urinaires.
- Hektoen : sert à isoler les bactéries à Gram négatif notamment les Entérobactéries appartenant au genre *Salmonella* et *Shigella*.
- Chapman : sert à l'isolement des bactéries du genre *Staphylococcus*.
- BEA : ce milieu sert à isoler les Streptocoque de groupe D et les Entérocoques.
- Mac Conkey : sert à isoler les Entérobactéries, *Salmonella* et *Shigella*.

Une fois ensemencées, les boites de Pétri sont incubées à 37°C pendant 24 heures (Mac Faddin, 1985).

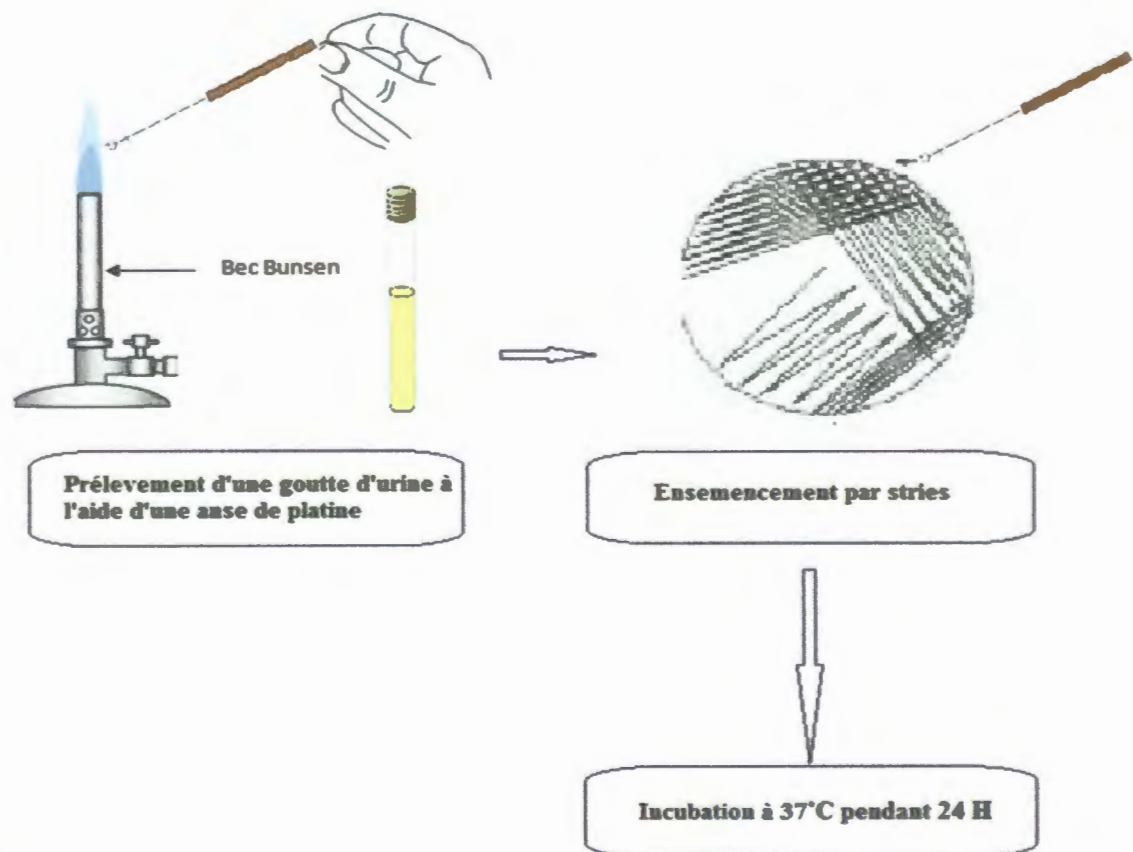


Schéma 1 : Techniques d'isolement des colonies responsables des infections urinaires.

II-3. Récupération des bactéries déjà identifiées :

Certaines bactéries responsables des infections urinaires sont récupérées du laboratoire des analyses médicales BEKIOUA de JIJEL. Ces bactéries sont : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* et *Citrobacter koseri*.

II-4. Vérification de la pureté des espèces :

Les colonies obtenues sur les milieux de culture sont caractérisées d'un point de vue macroscopique puis microscopique après coloration de Gram. L'objectif étant de vérifier la pureté des espèces.

Observation macroscopique : se fait directement sur la boîte de Pétri. L'objectif étant de déterminer l'aspect, la couleur, la consistance, etc. des colonies.

Observation microscopique : se fait tout d'abord à l'état frais, puis après coloration de Gram, au grossissement x 40 puis x100 (Gillet et *al.*, 2009).

Quand une espèce est pure, elle donne le même aspect des colonies, la même forme de cellule et le même type de Gram.

II-5. Préparation des extraits bruts de *Punica granatum* :

Pour la préparation des extraits bruts, nous utilisons l'écorce séchée du fruit de *Punica granatum*. Cette écorce est découpée finement avant l'utilisation.

L'extrait éthanolique est obtenu par macération du matériel végétal dans le solvant éthanol / eau (80/30 : v/v) pendant 8 h sous agitation (DulgeretGonus, 2004)

L'extrait méthanolique est obtenu par macération du matériel végétal dans le solvant méthanol / eau (70/30 : v/v) pendant 8h sous agitation (El-Haci et *al.*, 2012).

L'extrait acétonique est obtenu par macération du matériel végétal dans le solvant acétone / eau (70/30 : v/v) pendant 8h sous agitation.

Chaque solvant est ensuite filtré sur du papier filtre puis évaporé à sec au Rotavapor à des températures appropriées (55°C pour le méthanol, 55°C pour l'éthanol, 30°C pour acétone) (El-Haci et *al.*, 2012). Les molécules extraites sont récupérées avec de l'eau distillée stérile à raison d'une concentration 1 g / ml (schéma 2).



Schéma 2 : Protocole de préparation des extraits bruts de *Punica granatum*.

II-6. Test de l'activité antibactérienne des extraits :

Ce test est appliqué sur les colonies et les espèces isolées ainsi que sur les bactéries déjà identifiées récupérées du le laboratoire des analyses médicales BKIOUA de JJEL.

L'objectif du test bactérien est de déterminer parmi les extraits préparés ceux qui ont la plus grande activité inhibitrice des bactéries responsables des infections urinaires.

Les bactéries sont ensemencées par étalement à l'aide d'un écouvillon sur des boîtes de Pétri contenant la gélose Mueller-Hinton (Mac Faddin, 1985). Nous effectuons des puits sur la surface de la gélose avec un emporte-pièce puis nous remplissons les trous avec 15 μ l de l'extrait (schéma 3).

Comme témoin nous utilisons des disques d'antibiotiques (tétracycline) : à l'aide d'une pince stérile les disques sont déposés à la surface du milieu étalé par la suspension bactérienne.

Après diffusion, les boîtes sont incubées pendant 16 heures à 37 °C (Mac Faddin, 1985).

L'activité antibactérienne, quand elle était présente, se manifestait alors par des zones d'inhibition circulaire transparente correspond à l'absence de la croissance bactérienne. Plus le diamètre de cette zone est grand plus la souche est sensible (Mac Faddin, 1985).

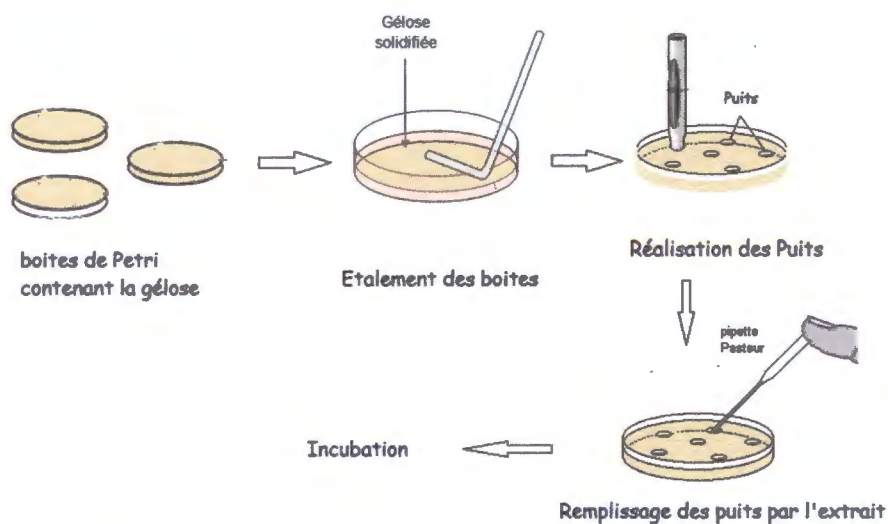


Schéma3 : Protocole du test de l'activité antibactérienne des extraits.

II-7. Test de l'activité antibactérienne des antibiotiques :

L'objectif du test est de savoir si les bactéries sont plus sensibles aux extraits bruts de *Punica granatum* qu'aux antibiotiques.

Nous utilisons deux types de médicaments : Ampimex (ampicilline sous forme de gélules) et Amoclan (constitué d'amoxicilline et d'acide clavulanique sous forme de poudre en sachet). Et Comme témoin nous utilisons des disques d'antibiotiques (Imipenème).

Les solutions mères sont préparées par dissolution de 1g de chaque antibiotique dans 3ml d'eau distillée stérile (Bouزيد et al., 2011).

Les bactéries sontensemencées par étalement à l'aide d'un écouvillon sur des boîtes de Pétri contenant la gélose Mueller-Hinton (Athamena et al.2010). Nous effectuons des puits sur la surface de la gélose avec un emporte-pièce puis nous remplissons chaque puits avec 15 μ l de la solution d'antibiotique.

Après diffusion, les boîtes sont incubées pendant 18 heures à 37 °C.

III. Résultats

III-1. Résultats des prélèvements d'urine

Après ensemencement sur les milieux sélectifs, nous obtenons les résultats suivants (tableau 2) :

Tableau 2 : Résultats des colonies apparues sur les milieux sélectifs.

	EMB	BEA	Mac Conkey	Hektoen	Chapman
1	-	-	-	-	-
2	+	-	-	+	-
3	+	-	-	+	-
4	-	+	-	-	-
5	+	+	+	+	-
6	+	-	+	+	+
7	+	-	+	+	-
8	-	-	-	-	-
9	-	+	-	-	-
10	+	-	+	+	-

(-) : absence de croissance bactérienne

(+) : présence de croissance bactérienne

Nous remarquons d'après ces résultats que l'échantillon 1 ne contient aucune colonie et donc aucune espèce qui puisse être isolée avec les milieux utilisés. L'échantillon 9 donne des colonies sur le milieu BEA seulement, ce qui indique que l'infection urinaire du patient est causé par des Entérocoques ou des Streptocoques du groupe D. Les échantillons 5 et 6 s'avèrent être ceux ayant donné une croissance sur le plus grand nombre de milieux, suivi des échantillons 7 et 10.

III-2. Caractérisation des colonies apparues sur les milieux sélectifs :

La caractérisation des colonies apparues sur les milieux sélectifs et la coloration de Gram nous permettent d'observer ce qui suit :

III-2-1. Sur le milieu EMB :

Echantillon 1 : aucune croissance.

Echantillon 2 : permet l'apparition de 2 types de colonies :

Souche 1 : Colonies de 1 à 2 mm de diamètre, bombées grisâtres au centre sombre, arrondies, bords réguliers et nets, structure laiteuse et fluide. Sous microscope la colonie apparait sous forme de bacilles à Gram négatif (photos 1 et 2).

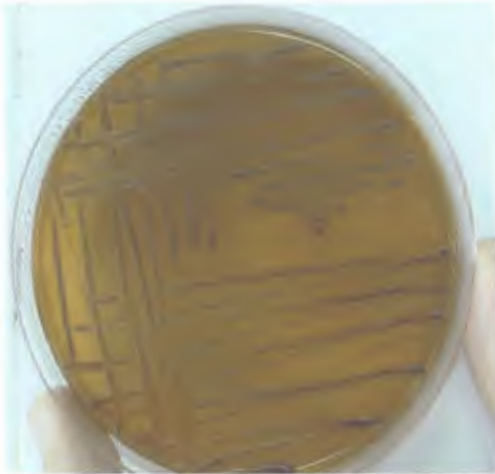


Photo 1 : Aspect de la souche 1 sur l'EMB

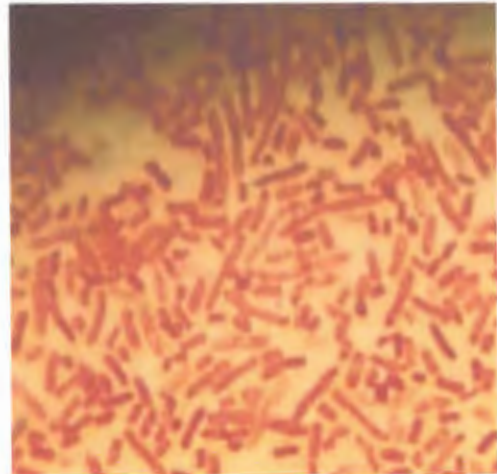


Photo 2 : Observation microscopique de la souche 1

Souche 2 : colonies petites 1 mm de diamètre, violettes, à bords réguliers, arrondies, aplaties et à structure laiteuse. Sous microscope la colonie apparait sous forme de coccobacilles à Gram négatif (photo 3)

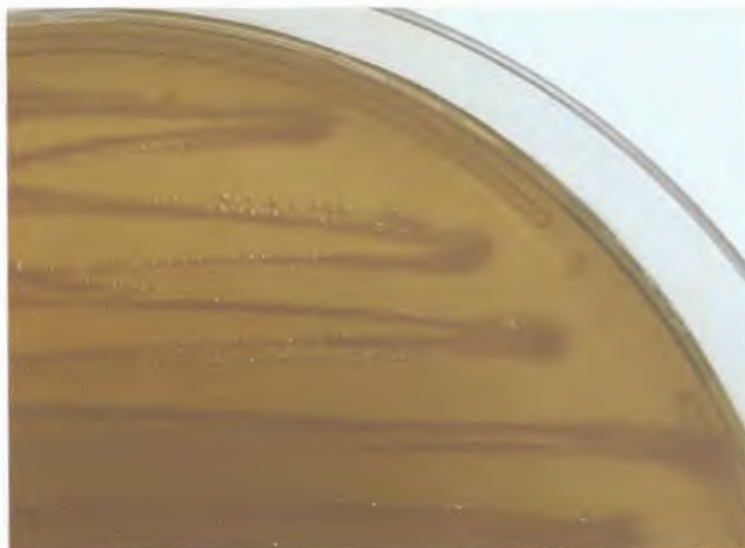


Photo 3 : Aspect de la souche 2 sur l'EMB

Echantillon 3 : souche 3: colonies petites, brunâtres, aplaties, brillantes, arrondies et a bords réguliers. Sous microscope la colonie apparait sous forme de bacilles à Gram négatif (photo 4).

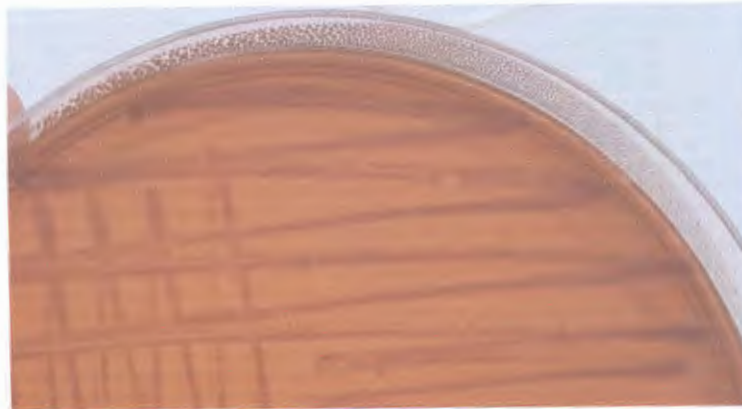


Photo 4 : Aspect de la souche 3 sur l'EMB

Echantillons 4 : aucune croissance.

Echantillons 5,6 ,7 : souche 4 : colonies très petites grisâtres, de 1 à 2 mm de diamètre, aplaties, arrondies, à centre foncé et à bords réguliers. Sous microscope la colonie apparait sous forme de bacille à Gram négatif (photo 5).

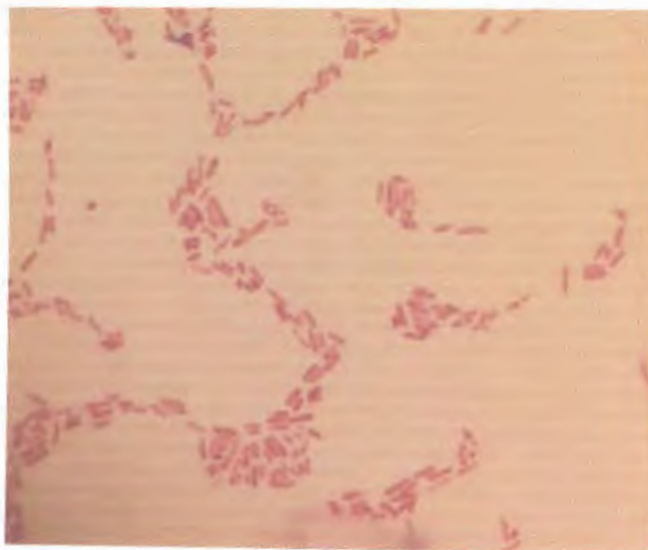


Photo 5 : Observation microscopique de la souche 4

Echantillon 8 : aucune croissance.

Echantillon 9 : aucune croissance.

Echantillon 10 : souche 5 : colonies de 2 à 3 mm de diamètre, de couleur violettes foncées, bombées, opaques, arrondies et à bords réguliers. Sous microscope la colonie apparait sous forme de bacilles à Gram négatif (photos 6 et 7).

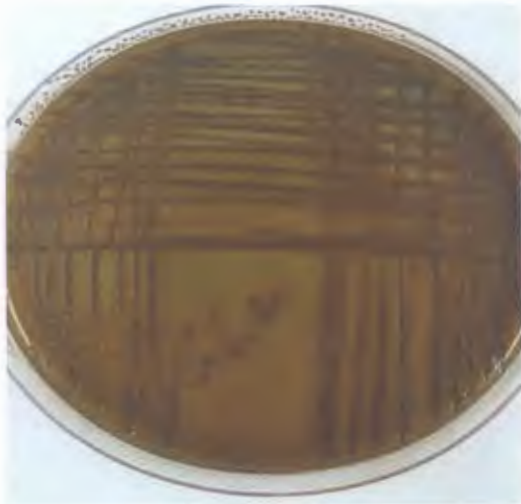


Photo 6 : Aspect de la souche 5 sur l'EMB **Photo 7** : Observation microscopique de souche 5

III-2-2. Sur le milieu BEA :

Echantillon 1 : aucune croissance.

Echantillon 2 : aucune croissance.

Echantillon 3 : aucune croissance.

Echantillon 4 : souche 6 : colonies petites, grises avec halo noir, 2 mm de diamètre, arrondies, semi-bombées et à bords réguliers. Sous microscope la colonie apparait sous forme de cocci à Gram positif (photo 8).



Photo 8 : Aspect de la souche 6 sur BEA

Echantillon 5 : souche 7 : colonies blanchâtres de 2 mm de diamètre sans halo noir, brillantes, arrondies, aux bords réguliers et aplaties. Sous microscope la colonie apparaît sous forme de cocci à Gram positif (photos 9 et 10).



Photo 9 : Aspect de la souche 7 sur BEA

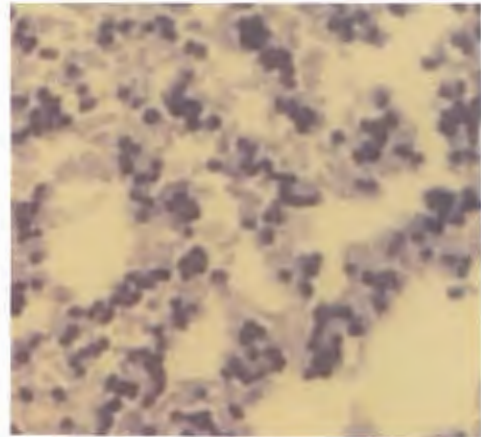


Photo 10 : Observation microscopique de la souche 7

Echantillon 6 : aucune croissance.

Echantillon 7 : aucune croissance.

Echantillon 8 : aucune croissance.

Echantillon 9 : souche 8 : colonies de 2 mm de diamètre, blanchâtres, arrondies, formes irrégulières, brillantes et visqueuses. Sous microscope la colonie apparait sous forme de cocci à Gram positif (photo 11).

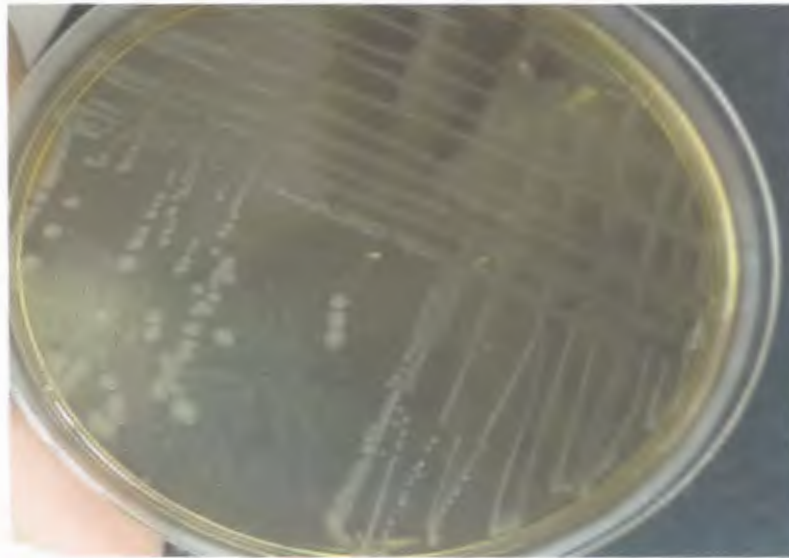


Photo 11 : Aspect de la souche 8 sur BEA

Echantillon 10 : aucune croissance.

III-2-3. Sur le milieu Mac Conkey :

Echantillon 1 : aucune croissance.

Echantillon2 : aucune croissance.

Echantillon3 : aucune croissance.

Echantillon 4 : aucune croissance.

Echantillon 5 ,6 ,7 : souche 9 : colonies de 1 à 2 mm de diamètre, grises, arrondies, brillantes, régulières et aplaties. Sous microscope la colonie apparait sous forme de bacille à Gram négatif (photos 12 et 13).



Photo 12 : Aspect de la souche 9 sur Mac Conkey

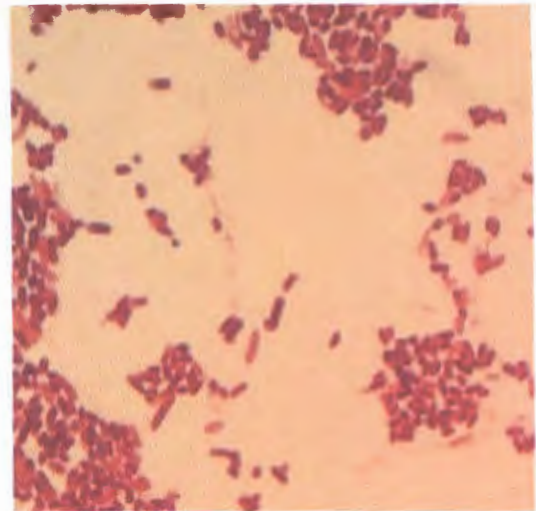


Photo 13 : Observation microscopique de la souche 9

Echantillon 8 : aucune croissance.

Echantillon 9 : aucune croissance

Echantillon 10 : souche 10 : Colonies petites semi-bombées, de 2 à 3 mm de diamètre, couleur beige avec un centre foncé, opaques, brillantes, laiteuses. Sous microscope la bactérie apparaît sous forme de bacille à Gram négatif (photo 14)

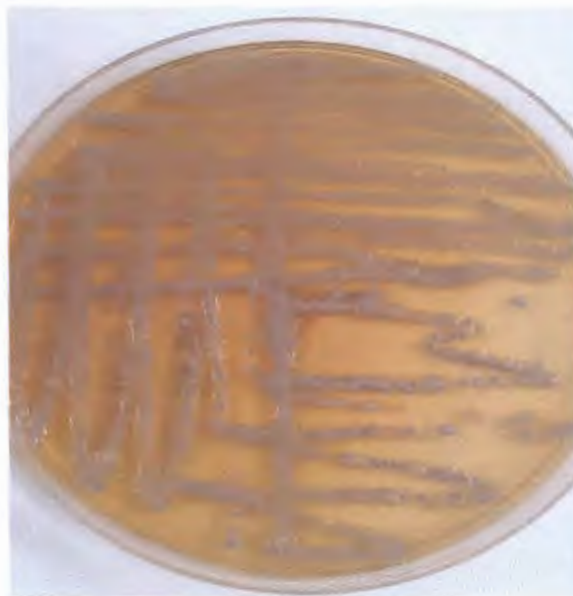


Photo 14 : Aspect de la souche 10 sur Mac Conkey

III-2-4. Sur le milieu Hektoen :

Echantillon 4 : aucune croissance.

Echantillons 5, 6, 7 : souche 11 : colonies petites, de couleur saumon (orange), diamètre inférieur à 2 mm, à bords irréguliers, brillantes. Sous microscope la colonie apparaît sous forme de bacille à Gram négatif (photo 15).

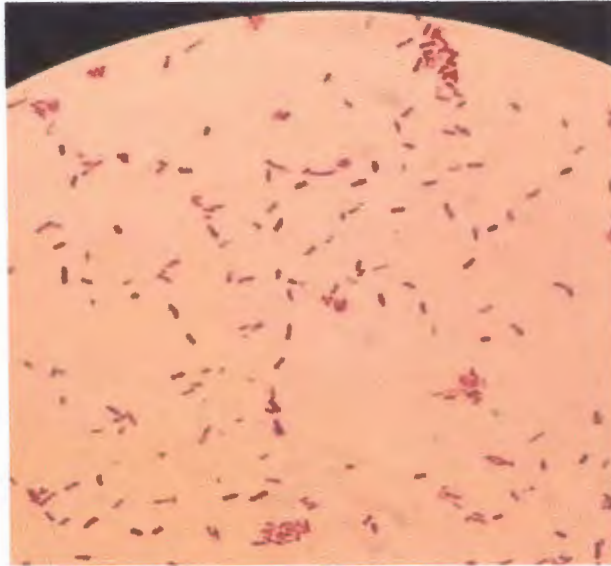


Photo 15 : Observation microscopique de la souche 11

Echantillon 8 : aucune croissance.

Echantillon 9 : aucune croissance.

Echantillon 10 : souche 12 : colonies de couleur saumon, de 2 mm de diamètre, arrondies, aplaties, opaques et à bords réguliers provoquant un changement de couleur du milieu (du vert à l'orange). Sous microscope les cellules apparaissent sous forme de bacille à Gram négatif (photos 16 et 17).



Photo 16 : Aspect de la souche 12 sur Hektoen

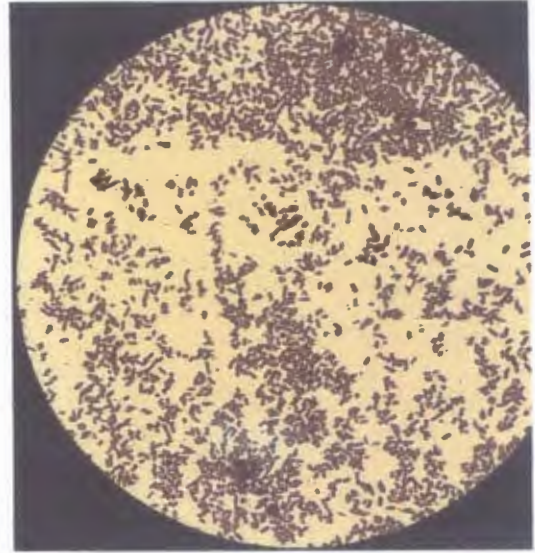


Photo 17 : Observation microscopique de la souche 12

III-2-5. Sur le milieu Chapman :

Echantillon1 : aucune croissance.

Echantillon2 : aucune croissance.

Echantillon3 : aucune croissance.

Echantillon4 : aucune croissance.

Echantillon 5 : aucune croissance.

Echantillon 6 : souche 13: colonies incolores, d'environ 2 mm de diamètre, arrondies entourées d'un halo clair, aplaties et brillantes. Sous microscope la colonie apparait sous forme de cocci à Gram positif (photo 18).



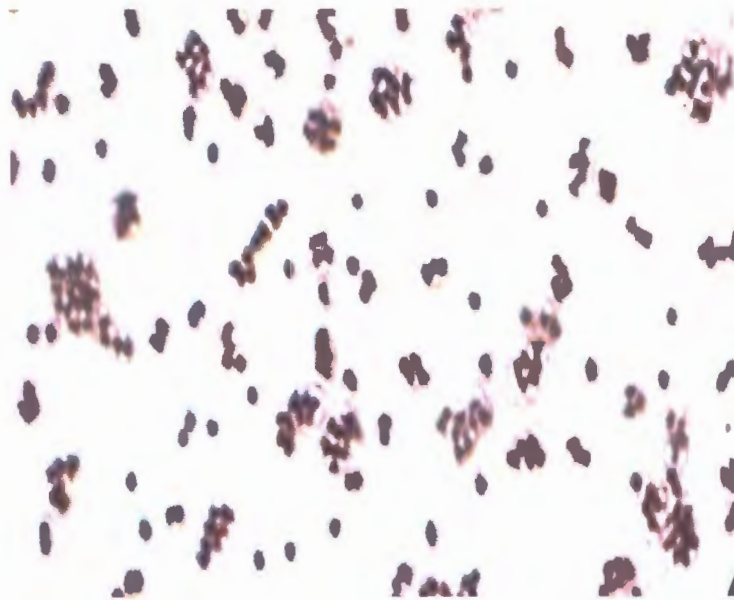


Photo 18 : Observation microscopique de la souche 13

Echantillon 7 : aucune croissance.

Echantillon 8 : aucune croissance.

Echantillon9 : aucune croissance.

Echantillon10 : aucune croissance.

III-3. Confirmation de la pureté des espèces apportées des laboratoires :

Klebsiella pneumoniae : sur la gélose Hektoen les colonies de *Klebsiella pneumoniae* sont saumon de 1 à 2 mm de diamètre, arrondies, réguliers et muqueuses provoquant un changement de couleur du milieu (du vert à l'orange). Sous microscope, l'espèce apparait sous forme de bacilles à Gram négatif (photo 19).

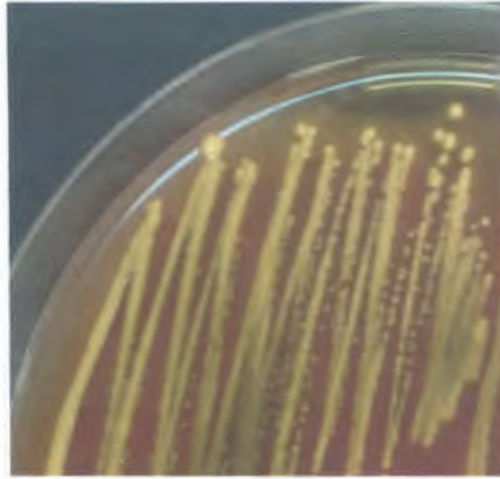


Photo 19 : Aspect de *Klebsiella pneumoniae* sur Hektoen

Staphylococcus aureus : sur milieu Chapman, *Staphylococcus aureus* est de couleur jaune doré, 1 à 2 mm de diamètre. Sous microscope l'espèce apparaît sous forme des coques Gram positif ayant un aspect en grappe de raisin (photo 20).

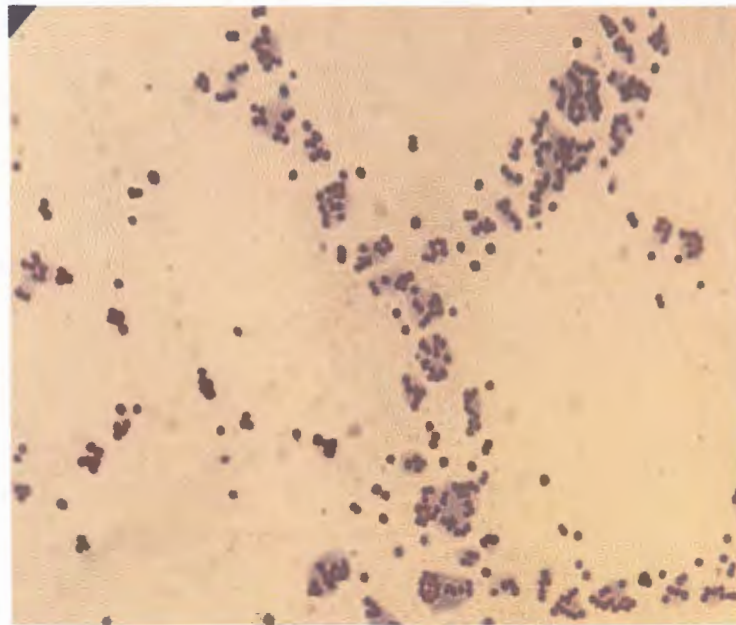


Photo 20 : Observation microscopique de *Staphylococcus aureus*

Escherichia coli : colonies jaune-saumon 1 à 2 mm de diamètre, arrondies, lisses et opaques. Provoquant un changement de couleur du milieu (du vert à l'orange). Sous microscope l'espèce apparaît sous forme de bacilles à Gram négatif (photos 21 et 22).

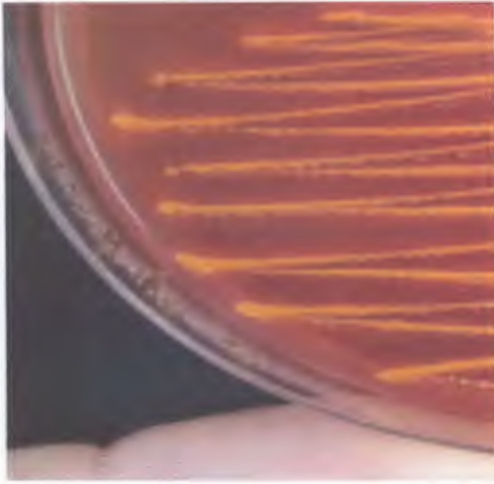


Photo 21 : Aspect d'*Escherichia coli* sur Hektoen

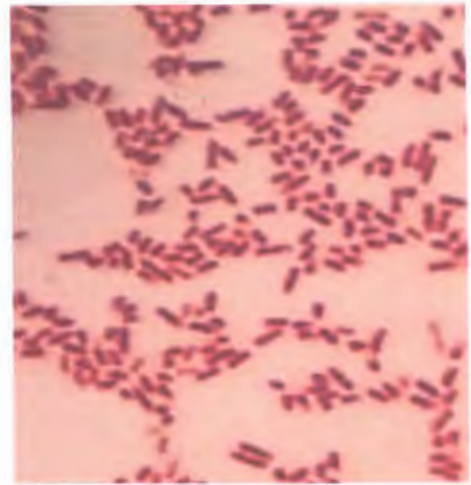


Photo 22 : Observation microscopique d'*Escherichia coli*

Enterobacter cloacae : colonies de couleur saumon, 1 à 2 mm de diamètre provoquant un changement de couleur du milieu (du vert à l'orange). Sous microscope optique l'espèce apparaît sous forme de bacille à Gram négatif (photo 23).

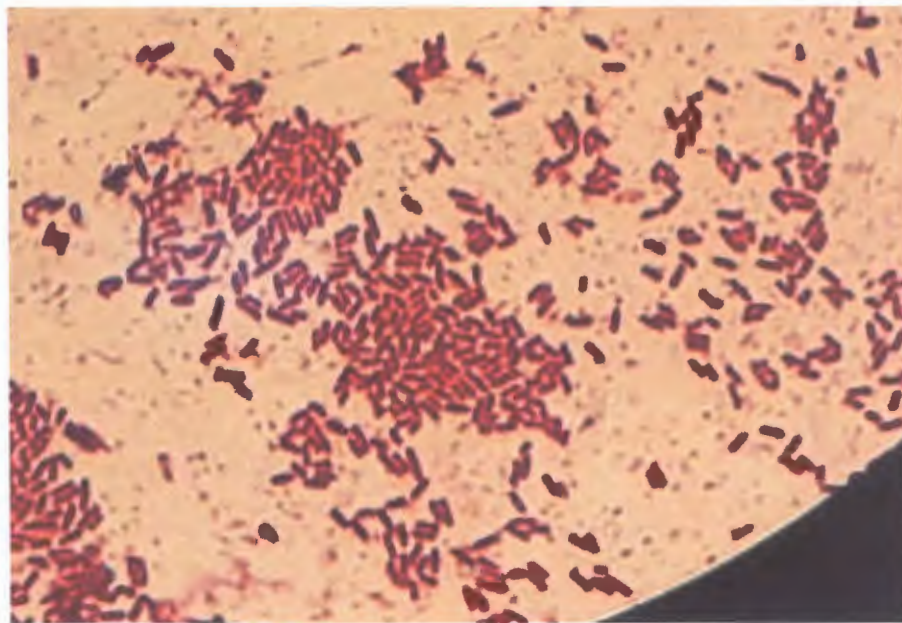


Photo 23 : Observation microscopique d'*Enterobacter cloacae*

Citrobacter koseri : Colonies de couleur saumon, arrondie. Provoquant un changement de couleur du milieu (du vert à l'orange). Sous microscope optique l'espèce apparaît sous forme de coccobacille à Gram négatif (photo 24).

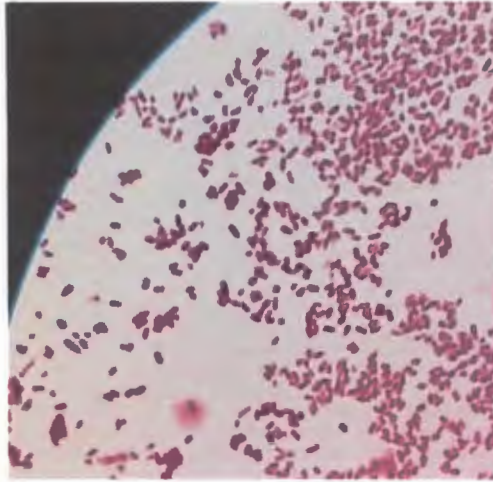


Photo 24 : Observation microscopique de *Citrobacter koseri*

Toutes les espèces apportées des laboratoires s'avèrent pures et correspondent au type de Gram des espèces annoncées.

III-4. Résultats de l'activité antibactérienne des extraits bruts :

Le test de l'activité antibactérienne nous donne les résultats cités dans le tableau 3. La souche *Escherichia coli* ATCC 25922 qui est utilisée comme bactérie témoin montre des zones de 23 mm et 25 mm pour les extraits éthanoliques et méthanoliques respectivement. Elle est par contre résistante à l'extrait acetonique. Cette bactérie est aussi sensible aux antibiotiques utilisés notamment l'Amoclan et l'Ampimex. Ceci indique que les infections urinaires causées par cette souche pourraient être éventuellement traitées par les extraits et les antibiotiques cités.

Tableau 3 : Résultats de l'activité antibactérienne exprimés en mm.

	Extrait méthanolique	Extrait éthanolique	Extrait acétonique	Amoclan	Ampimex	Imipenème
Souche 1	-	-	-	44 mm	34 mm	32 mm
Souche 2	-	-	-	45 mm	29 mm	38 mm
Souche 3	28 mm	18 mm	-	40 mm	24 mm	35 mm
Souche 4	16 mm	12 mm	13 mm	39 mm	20 mm	37 mm
Souche 5	31 mm	37 mm	-	37 mm	17 mm	30 mm
Souche 6	27 mm	14 mm	13 mm	38 mm	17 mm	32 mm
Souche 7	30 mm	13 mm	15 mm	38 mm	18 mm	34 mm
Souche 8	36 mm	15 mm	20 mm	35 mm	19 mm	32 mm
Souche 9	17 mm	-	-	39 mm	15 mm	36 mm
Souche10	23 mm	13 mm	6 mm	37 mm	15 mm	31 mm.
Souche 11	-	-	-	35 mm	17 mm	20 mm
Souche 12	31 mm	36 mm	28 mm	37 mm	16 mm	30 mm
Souche 13	23 mm	20 mm	26 mm	38 mm	18 mm	31 mm
<i>Staphylococcus aureus</i>	48 mm	22 mm	25 mm	49 mm	44 mm	46 mm
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	23 mm	-	-	35 mm	15 mm	33 mm
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-	25 mm	-	29 mm
<i>Citrobacter koseri</i>	-	-	-	39 mm	20 mm	36 mm
<i>Escherichia coli ATCC 25922</i>	25 mm	23 mm	-	36 mm	27 mm	34 mm

Chiffre en gras : Meilleures valeurs de l'activité antibactérienne.

Nous remarquons que les zones d'inhibition apparaissent sur les boîtes de Pétri sous deux formes : soit avec des contours nets, qu'ils soient réguliers ou irréguliers, nous les appelons alors « zones nettes » comme dans le cas des photos 25 et 26 soit avec des contours non précis et des colonies qui diminuent progressivement nous les appelons « zones diffusionnelles » comme dans le cas de photo 27 (Ilic et al., 2004).

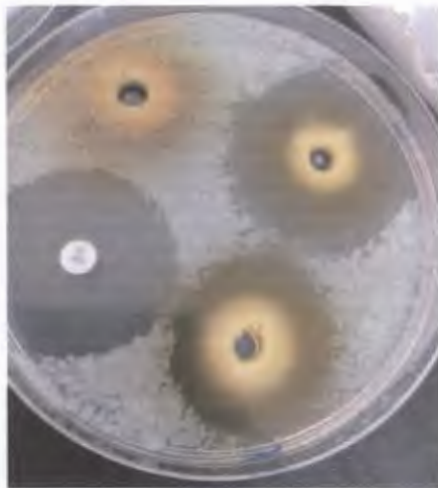


Photo 25 : zones nettes aux bords irréguliers

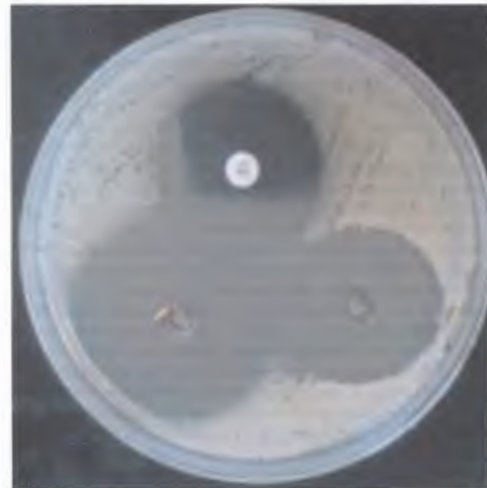


Photo 26 : zones nettes aux bords réguliers

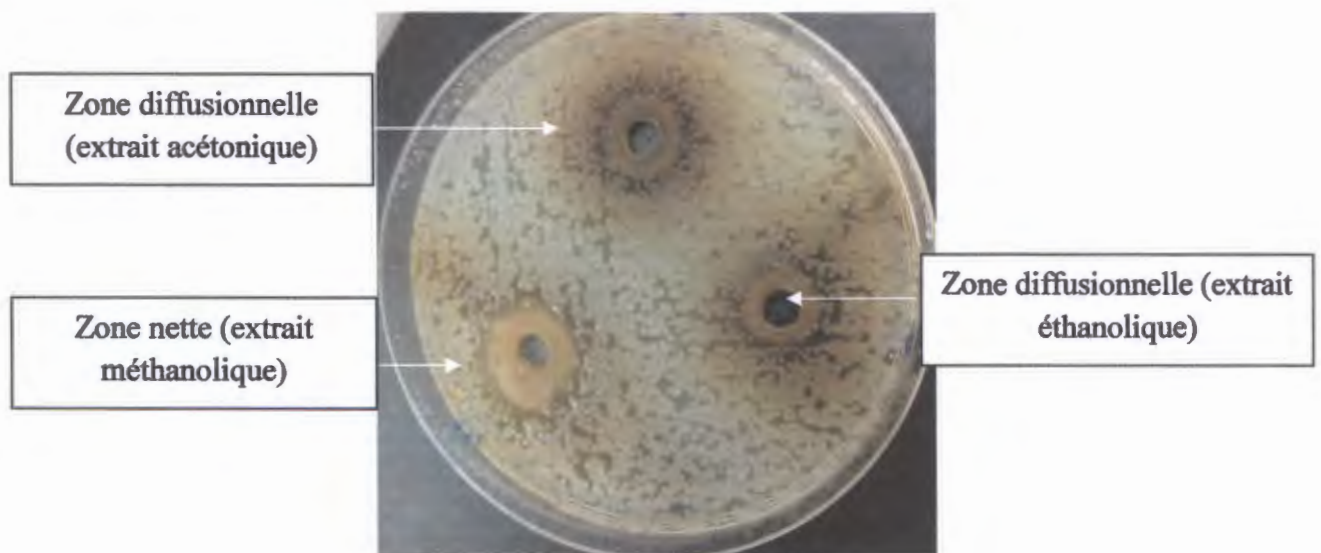


Photo 27 : Types des zones d'inhibition.

Nous remarquons que les souches 1, 2, 11 et les espèces *Enterobacter cloacae* et *Citrobacter koseri* montrent une résistance vis-à-vis des extraits éthanoliques, méthanoliques et acétoniques de *Punica granatum* (Photo 28, 29 et 30).

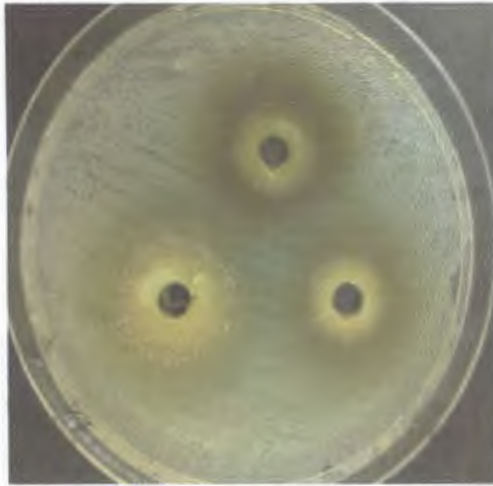


Photo 28 : Absence de l'activité antibactérienne des extraits sur *Citrobacter koseri*

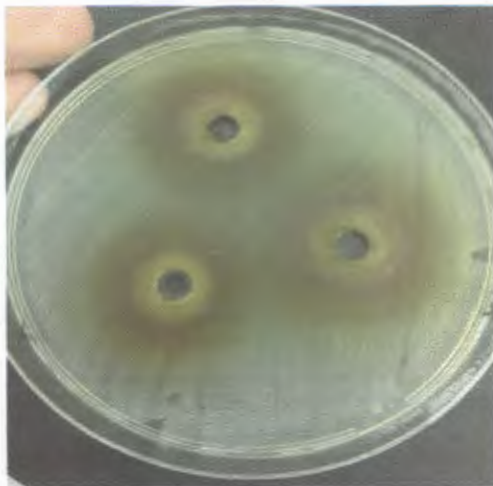


Photo 29 : Absence de l'activité antibactérienne des extraits sur *Enterobacter cloacae*

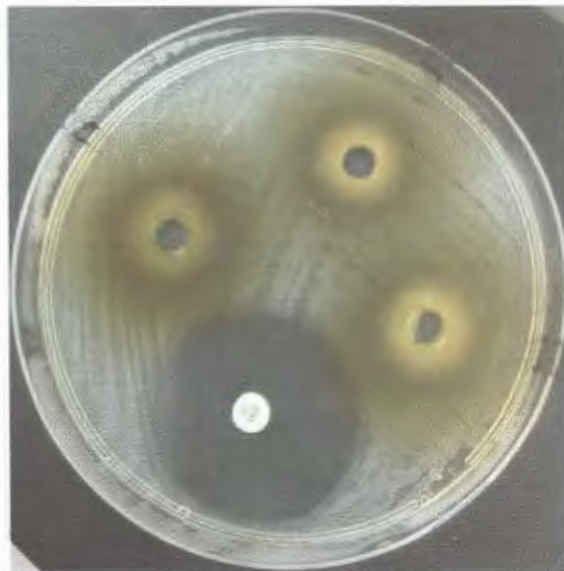


Photo 30 : Absence de l'activité antibactérienne des extraits sur la souche 2

Les autres bactéries montrent toutes une sensibilité vis-à-vis ces extraits mis à part les souches 3,5, 9, *Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli* qui montrent une résistance contre l'extrait acétonique de *Punica granatum*, de même la souche 9 et *Klebsiella pneumoniae* montrent une résistance contre l'extrait éthanolique de *Punica granatum* (photo 31 et 32).



Photo 31 : Activité antibactérienne des extraits sur la souche 9



Photo 32 : Activité antibactérienne des extraits sur la souche 3

La plus grande zone d'inhibition est donnée par l'extrait méthanolique contre *Staphylococcus aureus* avec une valeur de 48 mm (photo 33) suivie de l'extrait éthanolique contre la souche 5 qui montre une zone d'inhibition de 37 mm de diamètre (photo 34), puis de l'extrait méthanolique et éthanolique contre les souches 8 et 12 respectivement avec une valeur de 36 mm.

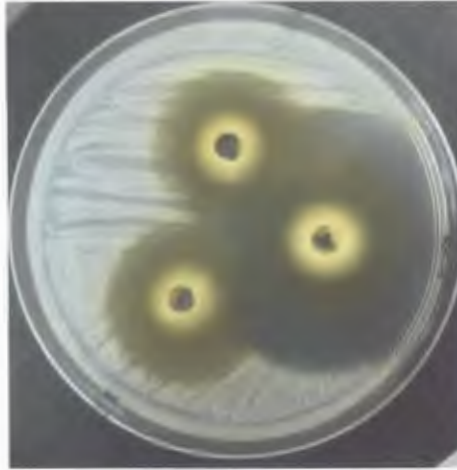


Photo 33 : Activité antibactérienne des extraits sur *Staphylococcus aureus*

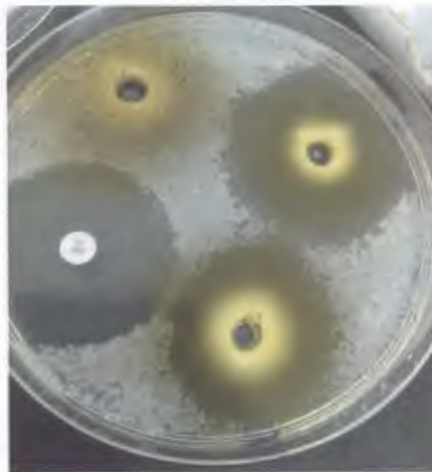


Photo 34 : Activité antibactérienne des extraits sur la souche 5

D'un autre côté, les plus faibles zone d'inhibition sont données par les extraits acétoniques contre la souche 10 avec une valeur de 6 mm aussi contre la souche 4 et 6 avec une valeur de 13 mm (photo 35).

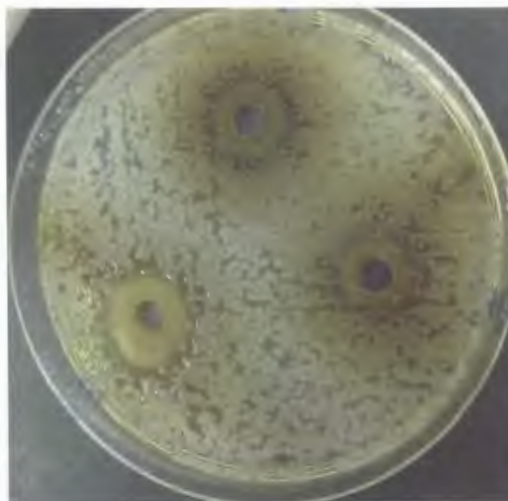


Photo 35 : Activité antibactérienne de l'extrait acétonique sur la souche 4

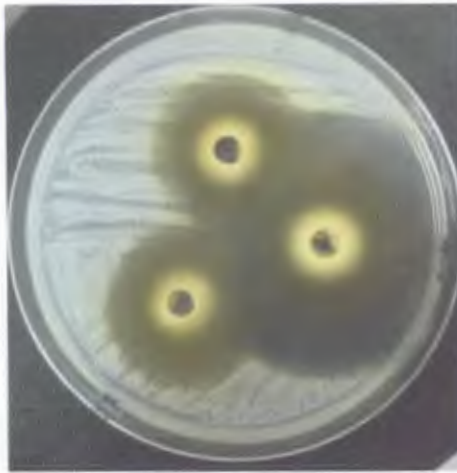


Photo 33 : Activité antibactérienne des extraits sur *Staphylococcus aureus*

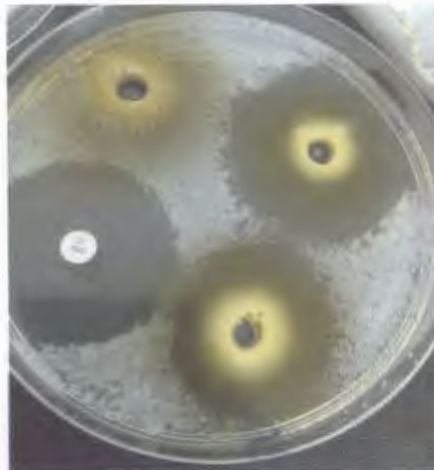


Photo 34 : Activité antibactérienne des extraits sur la souche 5

D'un autre côté, les plus faibles zone d'inhibition sont données par les extraits acétoniques contre la souche 10 avec une valeur de 6 mm aussi contre la souche 4 et 6 avec une valeur de 13 mm (photo 35).

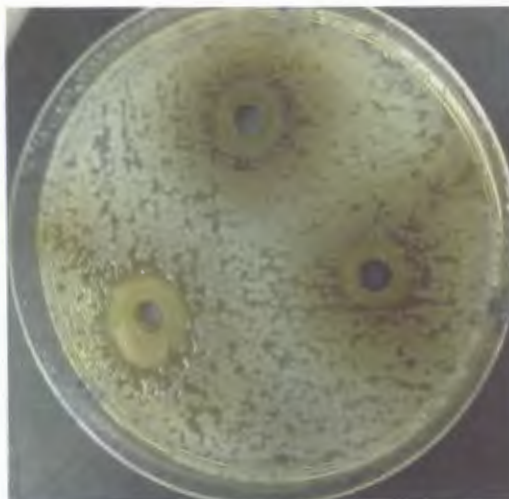


Photo 35 : Activité antibactérienne de l'extrait acétonique sur la souche 4

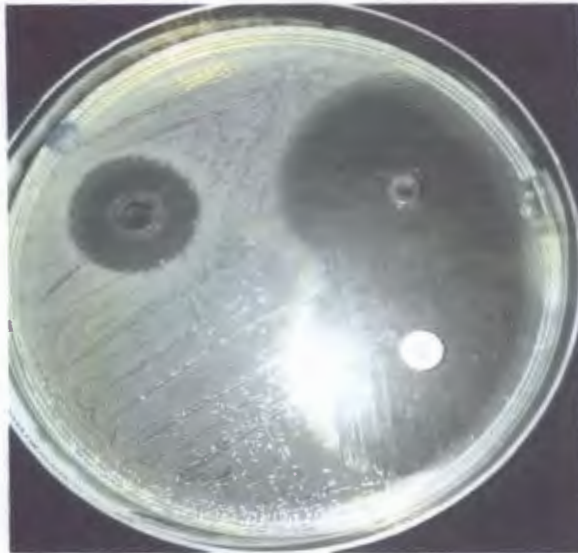


Photo 38 : Activité antibactérienne des antibiotiques sur *Citrobacter koseri*

Les résultats de l'activité antimicrobienne des antibiotiques montrent que ces derniers donnent des zones d'inhibition très grandes pour beaucoup de souches et d'espèces utilisées. Même, les plus faibles zones d'inhibition apportées par les antibiotiques demeurent supérieures à 15 mm. Aussi, les souches 1, 2, 11 et les espèces *Enterobacter cloacae* et *Citrobacter koseri* sont résistantes à tous les extraits bruts mais sensibles aux antibiotiques utilisés.

Ceci indique que les antibiotiques ont une activité supérieure à celle des extraits bruts de *Punica granatum*.

Discussion

Les souches 1, 2, 3, 4 et 5 sont supposées être des Entérobactéries car elles donnent croissance sur le milieu EMB et apparaissent après la coloration de Gram sous forme de bacille à Gram négatif. Xu et *al.*, (2015) ont déjà affirmé que les Entérobactéries sont les principales bactéries responsables des infections urinaires, notamment *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Les souches 1 et 2 sont insensibles aux extraits méthanoliques, éthanoliques et acétoniques de *Punica granatum*, les souches 3 et 5 montrent une sensibilité vis-à-vis les extraits éthanoliques et méthanoliques de *Punica granatum* par contre elles sont résistantes vis-à-vis de l'extrait acétonique. La souche 4 est sensible aux extraits méthanoliques, éthanoliques et acétonique. Ces résultats se conforment à ceux d'Anjana et *al.*, (2009) et Sajjad et *al.*, (2015) qui indiquaient que les extraits éthanolique, méthanolique et acétonique de *Punica granatum* possédaient une activité antibactérienne contre *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* responsables des infections urinaires. La présence des composants bioactifs dans ces extraits comme les phénols, les tannins et les flavonoïdes pourraient expliquer ces activités. Notamment l'acide gallique, l'acide ellagique, la punicalagine qui ont montré une bonne activité antibactérienne (Dahham et *al.*, 2010, Fawole et *al.*, 2012, Anibal et *al.*, 2013, Lairini et *al.*, 2014).

Ces souches sont aussi sensibles à l'amoclan et à l'ampimex, ces résultats sont proches à ceux d'Odongo et *al.*, (2013) qui indiquaient que la meilleure activité antibactérienne vis-à-vis les bactéries responsable des infections urinaires notamment *Escherichia coli* est obtenue par l'association d'amoxicilline et l'acide clavunonique.

Les souches 6, 7 ,8 qui ont donnés croissance sur le milieu BEA spécifique des Entérocoques et des Streptocoques du groupe D, et qui apparaissent après la coloration de Gram sous forme de cocci à Gram positif sont sensibles aux extraits éthanoliques et acétoniques de *Punica granatum*, conformément aux travaux réalisés par Anjana et *al.*, (2009) qui indiquaient que les extraits éthanoliques et acétoniques de cette plante possédaient une activité antibactérienne vis-à-vis *Enterococcus faecalis*. D'autres recherches confirment la présence des Entérocoques et des Streptocoques du groupe D chez les patients atteints d'infection urinaire (Goel et *al.*, 2016).

Nos résultats montrent aussi la sensibilité des souches 6, 7, 8 vis-à-vis l'amoclan et l'ampimex conformément aux travaux de Garlapati et ses collaborateurs (2016) qui indiquaient que l'association de l'amoxicilline et acide calvunonique présentait une forte activité antibactérienne vis-à-vis *Enterococcus faecalis*. Et aux travaux réalisés par Vachée et ses confrères (2009) qui affirmaient que l'ampicilline avait une grande activité antibactérienne sur les Entérocoques.

Nous supposons que les souches 9, 10, 11 et 12 sont des Entérobactéries et peut être même des *Salmonella* et des *Shigella* puisque elles donnent une croissance sur le milieu Hektoen et Mac Conkey et qui apparaissent après la coloration de Gram sous forme de bacille à Gram négatif. Les travaux de Tang et Chao (2016) et de Karakaş et al., (2016) confirment que ces genres peuvent causer des infections urinaires.

Les souches 9 et 11 sont les plus résistantes aux extraits utilisés. En effet, la souche 11 est insensible à tous les extraits de *Punica granatum*. La souche 9 quant-à elle montre une sensibilité à l'extrait méthanolique seulement.

Les souches 10 et 12 sont sensibles à l'extrait méthanolique, éthanolique et acétonique conformément aux résultats de Khan et Hanee (2011) et de Panchal et al., (2013) qui indiquaient que les extraits méthanoliques et éthanoliques avaient une activité antibactérienne contre *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* et aux travaux de Choi et ses collaborateurs (2011) qui montraient que l'extrait éthanolique de *Punica granatum* possédait une activité vis-à-vis certaines souches de *Salmonella*.

Nos résultats montrent aussi la sensibilité des souches 9, 10, 11 et 12 vis-à-vis l'Amoclan et l'Ampimex, ceci conformément aux résultats d'Odongo et al., (2013) qui montraient que la majorité des Entérobactéries responsables des infections urinaires notamment *Enterobacter*, *Proteus*, *Escherichia coli* possédaient une sensibilité à l'amoxicilline associée à l'acide clavulanique. Aussi les travaux de Nousbaum (2015) affirmaient que l'amoxicilline - acide clavulanique avait une efficacité contre la majorité des Entérobactéries principalement *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae*. L'étude de Choi et al., (2013) indiquaient que l'ampicilline possédait une activité antibactérienne contre certaines souches de *Salmonella*.

La souche 13 qui donne croissance sur le milieu Chapman spécifique à *Staphylococcus aureus* est sensible pour les extraits méthanoliques, éthanoliques et acétoniques de *Punica granatum* conformément aux travaux de Mahboubi et al., (2015). Ces mêmes travaux indiquaient que l'extrait méthanolique de cette plante contenait principalement des acides phénoliques et des flavonoïdes ayant une activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus*.

Une étude réalisée sur *Staphylococcus aureus* a démontré que cette dernière était sensible à l'amoxicilline-acide clavulanique conformément à nos résultats (Odongo et al., 2013).

Staphylococcus aureus montre une sensibilité vis-à-vis l'extrait méthanolique et éthanolique de *Punica granatum*. Ces résultats sont similaires à ceux des autres études réalisées auparavant qui affirmaient que les extraits méthanoliques et éthanoliques étaient effectivement actifs sur cette bactérie (Prashanth et al., 2001, Mahboubi et al., 2015, Sajjad et al., 2015). Les

travaux de Sajjad et ses collaborateurs (2015) indiquaient que l'extrait méthanolique de *Punica granatum* contenait principalement des tannins, des flavonoïdes, et des alcaloïdes. Aucun autre travail n'a été reporté sur l'activité de l'extrait acétonique contre *Staphylococcus aureus*, malgré que nos résultats montrent que cet extrait est plutôt actif contre elle.

Une étude réalisée sur *Staphylococcus aureus* a démontré que cette dernière était sensible à l'amoxicilline-acide clavulanique (Odongo et al., 2013) conformément à nos résultats.

Escherichia coli est la bactérie la plus rencontrée dans les infections urinaires. En effet des études antérieures ont montré que (75 - 85 %) des infections urinaires sont due à *Escherichia coli* (Seck, 2005). Nos résultats montre que cette espèce a une sensibilité vis-à-vis de l'extrait méthanolique et éthanolique conformément aux travaux de Panchal et al., (2013) et de Khan and Haneef (2011). Une autre étude récente réalisée par Pagliarulo et ses collaborateurs (2016) a montré que l'extrait éthanolique de *Punica granatum* soutirait une plus grande diversité de composés, à savoir les anthocyanes, les tannins, les catéchines, l'acide gallique et l'acide ellagique qui agissent sur cette bactérie. Nos résultats montrent qu'*Escherichia coli* est insensible à l'extrait acétonique contrairement aux résultats d'Anjana et al., (2009) qui indiquaient que l'extrait acétonique possédait une activité antibactérienne contre cette bactérie.

Escherichia coli montre une sensibilité vis-à-vis les antibiotiques testés, ces résultats sont en accord avec ceux d'Odongo et ses collaborateurs (2013) qui indiquaient que l'amoxicilline - acide clavulanique possédaient une activité contre cette bactérie.

Une étude récente réalisée par Duong et ses collaborateurs (2015) a montré qu'*Escherichia coli* était résistant à l'ampicilline contrairement à notre travail qui démontre que cette espèce est sensible à cet antibiotique. Cette différence pourrait indiquer que notre souche a développé des résistances et est devenue nosocomiale.

Enterobacter cloacae montre une résistance contre l'extrait méthanolique, éthanolique et acétonique de *Punica granatum*. Aucun autre travail préalable n'a été trouvé pour montrer le comportement de cette espèce vis-à-vis des extraits de la plante.

Par contre Davin-regli et Pagés (2015) affirmaient qu'*Enterobacter cloacae* avait une résistance à l'ampicilline et à l'association amoxicilline - acide clavulanique. Nos résultats sont exactement les mêmes sauf pour l'amoclan qui donne une activité antibactérienne contre cette espèce.

Nos résultats montrent que *Citrobacter koseri* est insensible vis-à-vis tous les extraits de *Punica granatum*. Contrairement aux travaux de Fazio et al., (2009) qui ont montré que l'extrait de l'écorce de *Punica granatum* avait une activité antibactérienne remarquable contre cette espèce.

De même, nos résultats montrent une sensibilité de *Citrobacter koseri* vis-à-vis l'Amoclan, ce qui n'est pas en accord avec les recherches de Caltadirone et *al.*, (2015) qui ont indiqué que cette espèce était résistante à l'amoclan. Une autre étude réalisée démontrait que cette espèce était résistante aussi à l'ampicilline (Matyar, 2012) contrairement à nos résultats.

Klebsiella pneumoniae montre une sensibilité à l'extrait éthanolique conformément aux résultats de Duraipandiyani et *al.*, (2006) qui indiquaient que cette espèce possédait une sensibilité à cet extrait et aux travaux de Chebaibi et ses collaborateurs (2011) qui montraient que les extraits de *Punica granatum* possédaient une activité antibactérienne sur les Gram positifs et Gram négatifs notamment *Klebsiella pneumoniae*. Par contre, cette bactérie montre une résistance à l'extrait acétonique et méthanolique de *Punica granatum* ce qui n'est pas en accord avec Duraipandiyani et *al.*, (2006) et Fawole et *al.*, (2012).

Une autre étude réalisée par Hosbul et ses collaborateurs (2012) a montré que *Klebsiella pneumoniae* était résistante à l'amoxicilline - acide clavulanique. Contrairement à notre travail qui démontre que cette espèce est sensible à cette association. Cette différence de résultats peut être expliquée par une différence de concentration des antibiotiques dans l'amoclan.

Conclusion

Conclusion

Les isolements nous ont permis d'avoir des colonies sur les milieux EMB spécifique des Entérobactéries, BEA spécifique des Entérocoques et Streptocoques de groupe D, Chapman spécifiques de *Staphylococcus aureus*, Hektoen et Mac-Conkey spécifiques des Salmonelles et des Shigelles ainsi que d'autres Entérobactéries. Ceci nous a montré que les infections urinaires pouvaient être causées par une ou plusieurs bactéries simultanément.

Les échantillons 5 et 6 se sont avérés comme étant les plus riches en bactéries alors que les échantillons 4 et 9 étaient les moins riches. Ces derniers ont donné un seul type de colonies sur le milieu BEA indiquant ainsi qu'il s'agissait des Entérocoques ou de Streptocoque de groupe D.

Les colonies les plus résistants aux extraits de *Punica granatum* étaient les souches 1, 2, 11 et les espèces *Enterobacter cloacae* et *Citrobacter koseri* récupérées des laboratoires d'analyses. Ces bactéries ne montraient aucune sensibilité à l'ensemble des extraits testés. Et à l'inverse les souches les plus sensibles étaient 5, 8,12 et *Staphylococcus aureus*.

Les diamètres le plus importants étaient donnés par l'extrait méthanolique contre *Staphylococcus aureus* suivie de l'extrait éthanolique contre la souche 5, puis de l'extrait méthanolique et éthanolique contre les souches 8 et 12 respectivement.

Les bactéries isolées étaient toutes sensibles aux antibiotiques utilisés et ce avec de grands diamètres des zones d'inhibition, sauf *Enterobacter cloacae* qui a montré une résistance à l'Ampimex. Les diamètres les plus importants étaient donnés par l'Amoclan contre *Staphylococcus aureus* et la souche 2.

Nos résultats ont montré que tous les extraits de *Punica granatum* avaient une activité antibactérienne inférieure à celle des antibiotiques. En effet, ces derniers demeuraient plus actifs contre toutes les bactéries isolées et confirmaient de ce fait que *Punica granatum* n'était pas une plante de choix qui pouvait être utilisée pour remplacer les médicaments. Les extraits éthanolique, méthanolique et acétonique de cette plante n'étaient pas appropriés pour inhiber les bactéries responsables des infections urinaires.

References bibliographiques

Références bibliographiques

A:

- Al-Muammar MN, Khan F.** Obesity: the preventive role of the pomegranate (*Punica granatum*). *The International Journal of Applied and Basic Nutritional Sciences*. 2012, 28(6): 595-604.
- Anibal PC, Alves Peixoto IT, Foglio MA, Höfling JF.** Antifungal activity of the ethanolic extracts of *Punica granatum* L and evaluation of the morphological and structural modifications of its compounds up on the cells of *Candida* spp. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2013, 44(3): 839-848.
- Anjana S, Chandraker S, Patel VK, Ramteke P.** Antibacterial Activity of Medicinal Plants Against Pathogens causing Complicated Urinary Tract Infections. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2009, 71(2): 136-139.
- Anne DR, Pagés JM.** *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. *Frontiers in Microbiology*. 2015, 6: 392.
- Armbruster CE, Smith SN, Yep A, Mobley HL.** Increased incidence of urolithiasis and bacteremia during *Proteus mirabilis* and *Providencia stuartii* coinfection due to synergistic induction of urease activity. *Journal of Infectious Diseases*. 2014, 209(10): 1524-1532.
- Athamena S, Chalghem I, Kassah-Laouar A, Laroui S, Khebri S.** Activité anti-oxydante et antimicrobienne d'extraits de *Cuminum cyminum* L. *Lebanese Science Journal*. 2010, 11(1): 69-78.
- Avril L, Dabernat H, Denis F, Monteil H.** Bactériologie clinique. 2^{EME} édition. Marketing. Paris. 2000.
- Azzouz MA, Bullerman LB.** Comparative antimycotic effects of selected herbs, spices, plant components and commercial antifungal agents. *Journal of Food Protection*. 1982, 45: 1248-1301.

B:

- BARRIER LC.** Infections urinaires chez la personne âgée : difficultés du diagnostic microbiologique et impact de la prescription des ECBU pour la prise en charge des personnes âgées au CHU d'Angers. Thèse de doctorat en pharmacie, Université Angres. 2014. Page 26.

Belkacem N, Djaziri R, Lahfa F, El-Haci IA, Boucher Z. Phytochemical Screening and In Vitro Antioxidant Activity of Various *Punica granatum*l. Peel Extracts from Algeria: A Comparative Study. *Phytothérapie*. 2014, 12(6): 372-379.

Bhowmik D, Gopinath H, Pragati Kumar B, Duraivel S, Aravind G, Sampath Kumar KP. Medicinal Uses of *Punica granatum* and Its Health Benefits. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2013, 1(5): 28-35.

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

Bruyere F, Traxer O, Saussine C, Lechevallier E. Infection et lithiase urinaire. *Progrès en Urologie*. 2008, 18(2): 1015-1020.

C:

Chafai N. Les infections urinaires à l'hôpital militaire avicenne de marrakech. Thèse de doctorat en pharmacie, Université Mohammed V. 2008. Page 49.

Caltagirone M, Bitar I, Piazza A, Spalla M, Nucleo E, Navarra A, Migliavacca R. Detection of an IncA/C plasmid encoding VIM-4 and CMY-4 β -lactamases in *Klebsiella oxytoca* and *Citrobacter koseri* from an inpatient in a cardiac rehabilitation unit. *New Microbiologica*. 2015, 38(3): 387-392.

Caron F. Physiopathologie des infections urinaires nosocomiales. *Médecine et Maladies Infectieuses*. 2003, 33(9) : 438-446.

Cavallo J-D, Garrabé É. outils de diagnostic biologique des infections urinaires nosocomiales (IUN) : analyse critique. *Médecine et Maladies Infectieuses*. 2003, 33(9): 447-456.

Chebaibi A, Filali Rhazi F, Amine A, Zerhouni M. Effet bactéricide (*in vitro*) des extraits aqueux des feuilles du grenadier marocain (*Punica granatum* L.) sur des bactéries multirésistantes aux antibiotiques. *Phytothérapie*. 2011, 9(3): 158-164.

Choi JG, Kang OH, Lee YS, Chae HS, Oh YC, Brice OO, Kim MS, Sohn DH, Kim HS, Park H, Shin DW, Rho JR, Kwon DY. *In vitro* and *in Vivo* antibacterial activity of *Punica granatum* peel ethanol extract against *Salmonella*. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*. 2011, 5: 8.

الملخص :

العدوى البولية يمكن أن يكون سببها عدة انواع من البكتيريا , أهمها : les Entérobactéries

في عملنا نقوم بعزل البكتيريا المتسببة في هذه العدوى في اوساط زرع متخصصة و نختبر عليها النشاط المضاد للبكتيريا لكل من المستخلصات الخامة الخاصة بـ *Punica granatum* و المضادات الحيوية. يتم تحضير هذه المستخلصات بواسطة النقع في الايثانول المائي و الميثانول المائي و الأسيتون المائي مما يسمح لنا بالحصول على المستخلص الايثانولي, الميثانولي و الاسيتوني على التوالي. الأدوية المستعملة هي اموكلان و أمبيمكس.

النتائج تثبت أن المستخلصات الخامة تمتلك نشاط كمضادات للبكتيريا أقل بكثير من الأدوية حيث أن هذه الأخيرة تبقى الأكثر نشاطا ضد كل البكتيريا المعزولة. المستعمرات 1 و 2 و 11 و الأنواع *Enterobacter cloacae* و *Citrobacter koseri* تمتلك مقاومة لجميع المستخلصات المحضرة على العكس فهي حساسة للأدوية. المستعمرات 5, 8, و 12 و *Staphylococcus aureus* تعتبر على أنها البكتيريا الأكثر حساسية للمستخلصات. أيضا, نلاحظ أن الأموكلان يعطي أفضل النتائج ضد أغلب الأنواع البكتيرية. ختام هذا العمل هو أن مستخلصات الايثانول و الميثانول و الأسيتون ليست الأنسب لعلاج العدوى البولية و تبقى المضادات الحيوية الأكثر ملائمة بما في ذلك الأموكلان.

الكلمات المفاتيح : العدوى البولية، *P. granatum* ، المستخلص الخام، مضاد حيوي، نشاط مضاد للبكتيريا.

Résumé :

Les infections urinaires peuvent être causées par plusieurs types de bactéries, dont principalement les Entérobactéries. Dans ce travail, nous isolons les bactéries responsables de ces infections sur des milieux sélectifs, puis nous testons sur eux l'activité des extraits bruts de *Punica granatum* et des antibiotiques couramment prescrits. Les extraits de *P. granatum* sont préparés par macération dans l'éthanol aqueux, le méthanol aqueux et l'acétone aqueuse. Ce qui nous permet d'avoir les extraits éthanolique, méthanolique et acétonique respectivement. Les médicaments utilisés sont l'Amoclan, l'Ampimex et l'Imipenème.

Les résultats montrent que les extraits bruts ont une activité antibactérienne très inférieure à celle des médicaments. En effet, ces derniers demeurent plus actifs contre toutes les bactéries isolées. Les souches 1, 2,11 et les espèces *Enterobacter cloacae* et *Citrobacter koseri* sont complètement insensibles à tous les extraits préparés, par contre elles sont sensibles aux médicaments. Les colonies 5, 8,12 et *Staphylococcus aureus* sont considérées comme étant les bactéries les plus sensibles aux extraits. Aussi, nous observons que l'Amoclan donne les meilleurs résultats contre la majorité des espèces. La conclusion de ce travail est que les extraits éthanolique, méthanolique et acétonique de *P. granatum* ne sont pas les plus adaptés pour traiter les infections urinaires et que les antibiotiques demeurent plus appropriés, notamment l'Amoclan.

Mots clés : Infections urinaires, *Punica granatum*, extraits bruts, antibiotiques, activité antibactérienne.

Abstract:

Urinary infections may be caused by several types of bacteria, principally Enterobacteria. In this study, we isolate bacteria responsible on infectious diseases by using specific media, then we test on them the activity of *Punica granatum* crude extracts and some antibiotics usually prescribed. The extracts of *P. granatum* are prepared by maceration in aqueous ethanol, methanol and acetone. This allows us to obtain the ethanoic extract, methanolic extract and acetonic extract respectively. The used drugs are Amoclan, Ampimex and Imipenème.

The results show that the crude extracts have a very low activity compared to the drugs. In fact, the latter are more active against all the isolated bacteria. The colonies 1,2,11 and the species *Enterobacter cloacae* and *Citrobacter koseri* are resistant to all the extracts. But on the other hand they are sensitive to drugs. The strains 5,8,12 and *Staphylococcus aureus* are considered as the most sensitive species to the extracts. Also, we observe that Amoclan give the best antibacterial activity against the majority of bacteria. The conclusion of this study is tha the ethaolic, methanolic and acetonic extracts of *P. granatum* are not adequate for treating infectious diseases and that antibiotics remain more appropriate, notably Amoclan.

Keywords: Urinary infections, bacteria, isolation, *P. granatum*, crude extracts, antibiotics, antibacterial activity.