

République Algérienne Démocratique Et Populaire

Ministre De L'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Mohamed Kheider Biskra



Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la nature et de la vie

Département : Sciences de la nature et de la vie

Option : Biochimie et Biologie Moléculaire

Mémoire de fin d'étude Pour l'obtention du Diplôme de

MASTER

# THEME

## Activité antibactérienne des polyphénols et leur interaction moléculaire avec les antibiotiques

L'étudiant :

SAOULI Nadhir

Devant le jury :

Encadreur : TRABSA Hayat

Co-encadreur : BOUSSOUALIM Naouel

Président : ZOUAOUI Wafa

Examineur : BENCHERIF Selma

Promotion juin 2014

# R emerciement

*Je tiens à travers cet humble travail à remercier spécialement l'université Mohamed khidher département de la biologie pour toutes les faveurs qu'ils m'ont accordé en ouvrant grands les portes du savoir.*

*J'exprime mes gratitude à mes professeurs qui par leur compétences et connaissance qui nous ont fait savourer le vaste monde de la science, j'ai appris avec eux de faire la bonne analyse des faits.*

*Comme je remercié chaleureusement Melle Trabsa Hayat pour son encadrement, sa bonne vision et ses critiques constructives qui m'ont guidés pour la réalisation de ce travail, et Mlle Boussoualim Naouel chargé de cours département microbiologie université de Setif. Ainsi les membres de jury pour accepter de juger mon travail.*

*On n'oublie pas de remercier également tous mes camarades pour cette grande harmonie du groupe qui m'a été d'un grand réconfort.*

*Et enfin toutes mes vives reconnaissances à tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin à réaliser ce travail, mes chaleureux remerciements pour l'aide scientifique et matérielle.*

---

**SOMMAIRE**

Liste d' Abréviation	
Liste des Figures	
Liste des Tableaux	
<b>INTRODUCTION</b>	
<b>ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	
1.Les antibiotiques .....	02
2.Résistance bactérienne aux antibiotiques .....	02
2.1.Résistance naturelle .....	03
2.2.Résistance acquise .....	03
2.2.1.Résistance chromosomique .....	03
2.2.2.Résistance extra-chromosomique .....	03
3.Les $\beta$ -lactamines.....	03
3.1.Les classes des $\beta$ -lactamines.....	04
3.2. $\beta$ -lactamases à spectre élargi .....	04
3.3.Mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines.....	05
3.4.Mécanisme catalytique les $\beta$ -lactamines.....	05
3.5.Les inhibiteurs de $\beta$ -lactamases.....	06
3.5.1.Acide clavulanique .....	06
3.5.2.Sulbactam.....	06
3.5.3.Tazobactam.....	07
4.Les flavonoïdes .....	07
4.1.Structure et classification des flavonoïdes .....	07
4.2.Activités biologiques des flavonoïdes .....	09
4.2.1.Effets antimicrobiens .....	09
4.2.2.Effet antiallergique .....	09
4.2.3.Effets anti-inflammatoires.....	09
<b>MATERIELS ET METHODE</b>	
1.Matériels .....	10
1.1.Souches bactériennes .....	10
1.2.Produits .....	10
2. Méthode.....	10
<b>RESULTATS ET DISCUSSION</b>	
1.Antibiogramme .....	12

2.L'effet anti bactérienne des flavonoïdes .....	12
3.Le couplage des flavonoïdes -Antibiotiques .....	14
<b>CONCLUSION</b>	17
<b>REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	18
<b>ANNEXES</b>	

**LISTE DES TABLEAUX**

<b>Tableau 1.</b> Structure chimique de certains flavonoïdes représentatifs de chaque classe..	<b>08</b>
<b>Tableau 2.</b> Les diamètres des zones d'inhibition (mm) <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> et <i>Proteus vulgaris</i> provoquées par les antibiotique.....	<b>12</b>
<b>Tableau 3.</b> Les diamètres des zones d'inhibition (mm) <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> et <i>Proteus vulgaris</i> provoquées par les biomolécules.....	<b>13</b>
<b>Tableau 4.</b> Les diamètres des zones d'inhibition (mm) d' <i>Escherichia coli</i> provoquées par les flavonoïdes et les anibiotques.....	<b>15</b>
<b>Tableau 5.</b> Les diamètres des zones d'inhibition (mm) de <i>Klebsiella pneumoniae</i> provoquées par les flavonoïdes et les antibiotiques.....	<b>15</b>
<b>Tableau 6.</b> Les diamètres des zones d'inhibition (mm) de <i>Proteus vulgaris</i> provoquées par les flavonoïdes et les antibiotiques.....	<b>16</b>

---

**LISTE DES FIGURES**

<b>Figure 1.</b> Cibles de l'action des antibiotiques .....	02
<b>Figure 2.</b> Cycle d'un anneau $\beta$ -lactame et les structures du noyau de base des $\beta$ -lactamines. ....	04
<b>Figure 3.</b> Structure chimique des inhibiteurs de $\beta$ -lactamases .....	06
<b>Figure 4.</b> Structure générale des composés polyphénoliques.....	08

---

**LISTE DES ABBREVIATIONS**

ADN	Acide désoxyribonucléique
DMSO	Diméthyle sulfoxyde
AMC	Amoxicilline / Ac.Clavulanique
CTX	Céfotaxime
AMP	Ampicilline
GEN	Gentamicine
FOX	Céfoxitine
COL	Colistine
S	Streptomycine
PLP	Protéine liant pénicilline

---

## INTRODUCTION

La bactérie est un micro-organisme unicellulaire et sans noyau (procaryote) dont le génome est constitué d'ADN lui-même constitué d'un seul chromosome et on note éventuellement la présence de plasmides (petit morceau d'ADN circulaire). Chez l'Homme, certaines bactéries peuvent être pathogènes causant des infections qui provoquaient dans le passé (avant l'arrivée des antibiotiques) des millions de morts chaque année.

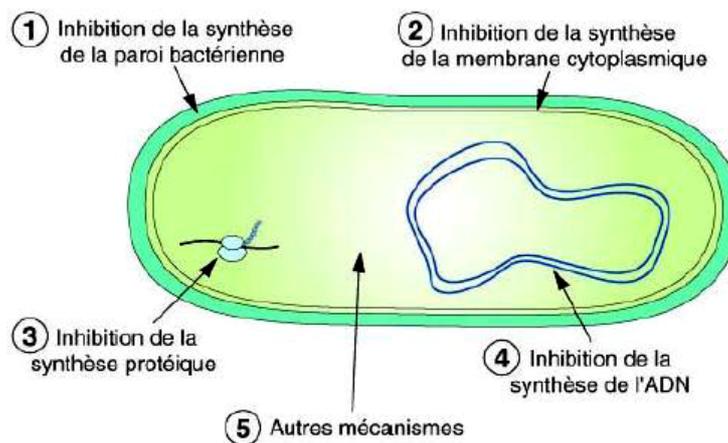
Les antibiotiques appartiennent à une classe de médicaments très prescrits pour lutter contre les bactéries qui sont responsables de très nombreuses maladies comme la tuberculose, la pneumonie, l'angine, la bronchite, infections urinaires, les abcès, l'acné,... etc. Il s'agit de la classe de médicaments la plus prescrite dans le monde.

La résistance des bactéries aux antibiotiques constitue un problème mondial comme les bactéries (BLSE). On ne cesse de lire des nouvelles sur les bactéries qui sont de plus en plus résistantes aux antibiotiques courants à cause de l'utilisation abusive de ces derniers par conséquent le traitement des infections sera plus difficile. On doit tous agir de façon responsable en ce qui concerne les antibiotiques.

De cette problématique qui concerne la résistance des bactéries aux antibiotiques, plusieurs recherches ont été effectuées dans ce sens qui ont aboutit à l'utilisation des flavonoïdes comme solution alternative aux antibiotiques. Nous avons fixé comme objectif, l'étude de l'effet d'activité antibactérienne de quelques flavonoïdes vis-à-vis quelques bactéries, l'étude de la relation entre structure et fonction d'une large gamme des flavonoïdes et l'interaction entre les flavonoïdes et antibiotiques.

## 1. Les antibiotiques

Les antibiotiques sont des substances destinées à agir sur les microorganismes indésirables principalement chez les humains. La majorité des antibiotiques actuels sont de nature synthétique ou semi synthétique. Actuellement on compte environ 250 antibiotiques disponibles. Le mode d'action des antibiotiques est connu car ils sont développés en fonction de leur « cible » (**Figure 1**), c'est à dire de l'effet de structure désiré. On les classe d'ailleurs selon leur mécanisme de destruction de la cellule bactérienne, antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi bactérienne, antibiotiques inhibant la synthèse de la membrane cytoplasmique, antibiotiques inhibiteurs de la synthèse protéique, antibiotiques inhibiteurs du métabolisme des acides nucléiques et de la synthèse de l'ADN et antibiotiques agissant par inhibition compétitive (exemple d'autres mécanismes) (**Pibiri, 2006**).



**Figure 1.** Cibles de l'action des antibiotiques (**Pibiri, 2006**).

## 2. Résistance bactérienne aux antibiotiques

Le recours à des médicaments antimicrobiens comme les antibiotiques pour traiter les maladies infectieuses constitue un point marquant dans l'histoire de la médecine. Mais en raison de l'usage généralisé de ces types de médicaments, plusieurs souches de grandes familles de bactéries pathogènes sont devenues résistantes à un ou plusieurs antibiotiques. De ce fait, la prolifération de ces microorganismes résistants pose un grave problème de santé à l'échelle mondiale (**Mehrotra et al., 2003**).

L'étude des mécanismes génétiques et biochimiques, permettent de mieux comprendre les bases moléculaires de la résistance aux antibiotiques et les facteurs responsables de sa dissémination. Cette résistance peut être soit naturelle, soit acquise (**Tandé, 2005**).

## 2.1. Résistance naturelle

La résistance naturelle est un caractère d'espèce qui touche toutes les cellules de toutes les souches. Elle est stable et se transmet à la descendance, mais elle n'est pas ou peu transmissible de manière horizontale. Elle a pour support génétique le chromosome bactérien et elle permet de définir le spectre d'activité des antibiotiques (**Kayser *et al.*, 2005**).

## 2.2. Résistance acquise

La résistance acquise est un caractère qui ne concerne que quelques souches d'une espèce donnée. La bactérie peut acquérir une résistance aux antibiotiques par deux mécanismes génétiques majeurs. L'un a pour support le chromosome il est défini comme une résistance chromosomique, l'autre a pour support les plasmides où les éléments transposables où les intégrons et on parle, dans ce cas, de résistance extra-chromosomique (**Maiti *et al.*, 2006**).

### 2.2.1. Résistance chromosomique

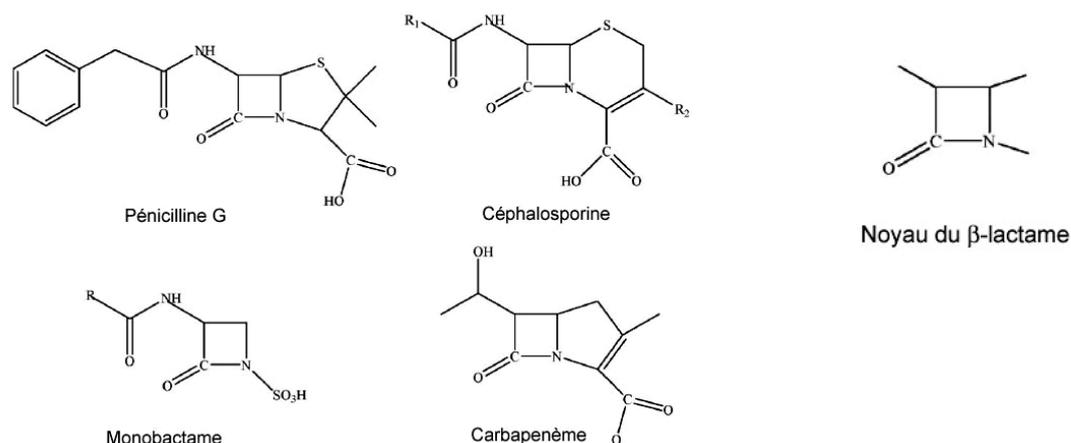
La résistance chromosomique résulte d'une mutation au niveau du chromosome ce qui a pour conséquence la perte ou la modification d'une protéine structurale ou enzymatique (**Franklin et Snow, 2005**).

### 2.2.2. Résistance extra-chromosomique

La résistance provient de l'acquisition de gènes par transfert entre bactéries, soit par conjugaison, transformation (pénétration dans une bactérie réceptrice d'ADN libre) ou transduction (transfert par l'intermédiaire d'un bactériophage). Les produits de synthèse assurent la résistance à un ou plusieurs antibiotiques (**Poly *et al.*, 2000**). Ces transferts sur un mode horizontal sont à l'origine d'une dissémination très importante au sein des populations bactériennes. Ainsi, la résistance plasmidique est souvent qualifiée de contagieuse ou d'infectieuse (**Maiti *et al.*, 2006**).

## 3. Les $\beta$ -lactamines

Les  $\beta$ -lactamines sont une grande famille d'antibiotiques utilisés dans le traitement de plusieurs infections à Gram positif et à Gram négatif. Ces molécules représentent plus de 65% du marché mondial des antibiotiques avec plus de 50 molécules commercialisée (**Poole, 2005**). Leurs structures ont en commun un cycle  $\beta$ -lactame nitré à 4 sommets qui constitue la fonction chimique indispensable à l'activité antibactérienne de la  $\beta$ -lactamine (**Figure 2**) (**Babic *et al.*, 2006**).



**Figure 2.** Cycle d'un anneau  $\beta$ -lactame et les structures du noyau de base des  $\beta$ -lactamines (Babic *et al.*, 2006).

### 3.1. Les classes des $\beta$ -lactamines

Les  $\beta$ -lactamines comprennent 4 sous-classes : les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes et les monobactames. **Les pénicillines** sont classées en fonction des différents substituants fixés à l'acide 6-aminopénicillanique, ce qui détermine des propriétés pharmacologiques et antibactériennes différentes. **Les céphalosporines** sont classées par génération et en fonction de leur spectre d'action anti-microbien. **Les monobactames** sont actifs sur les bacilles à Gram négatif et résistent relativement bien aux  $\beta$ -lactamases. Ils sont inactifs sur les bacilles à Gram positif et **les carbapénèmes** sont des  $\beta$ -lactames à large spectre réservés aux infections résistantes et aux infections à *Enterobacter* (Essack *et al.*, 2001).

### 3.2. $\beta$ -lactamases à spectre élargi

Les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BLSE) constituent un groupe d'enzymes qui ont la propriété commune de conférer la résistance aux pénicillines, à la 1<sup>ère</sup>, 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> génération de céphalosporines, à l'aztréoname (mais non aux céphamycines et carbapénèmes) par hydrolyse de ces antibiotiques, et qui sont inhibées par les inhibiteurs des  $\beta$ -lactamases tel l'acide clavulanique (Bush *et al.*, 1995).

La présence des BLSE a été décrite pour la première fois chez *Klebsiella ozaenae*, en 1983 en république fédérale d'Allemagne, puis en 1984 chez *K. pneumoniae* et *E. coli* en France et en Tunisie (Kliebe *et al.*, 1985 ; Knothe *et al.*, 1983). Ces enzymes avaient été désignées céfotaximase et ceftazidimase car elles conféraient aux bactéries qui les produisaient une résistance préférentielle à la céfotaxime ou à la ceftazidime. Elles inactivaient aussi d'autres

oxyimino- $\beta$ -lactamines telles que la ceftriaxone et l'aztréoname. La répartition de ces enzymes est aujourd'hui mondiale (**Bradford, 2001 ; Paterson et Bonomo, 2005**).

### 3.3. Mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

Les bactéries ont développé différents mécanismes pour contrecarrer l'action des  $\beta$ -lactamines (**Galleni *et al.*, 1995 ; Nikaido, 1998 ; Lakaye *et al.*, 1999 ; Walsh, 2003**) : modification de la cible (PLP) qui les rend moins sensibles aux  $\beta$ -lactamines mais permet de maintenir son activité physiologique normale. Synthèse des enzymes ( $\beta$ -lactamases) qui inactivent les  $\beta$ -lactamines par modification chimique. Acquisition ou surproduction des pompes efflux qui peuvent expulser l'antibiotique hors de la cellule même contre le gradient de concentration. Modification des porines chez les bactéries à Gram-négatif, ayant pour résultat la diffusion plus lente des  $\beta$ -lactamines à travers la membrane externe (**Livermore, 1995**).

### 3.4. Mécanisme catalytique les $\beta$ -lactamines

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes bactériennes qui ont effet catalytique sur l'hydrolyse de la liaison amide du cycle lactame des antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactamines. Les gènes qui codent pour ces enzymes sont d'origine chromosomique ou plasmidique. Ces gènes ont aussi été détectés sur des transposons et des intégrons facilitant ainsi le transfert horizontal de ces gènes entre espèces phylogénétiquement éloignées. La production des  $\beta$ -lactamases est le mécanisme de résistance le plus répandu et le plus important des bactéries vis-à-vis des  $\beta$ -lactamines (**Livermore, 1995**).

Toutes les  $\beta$ -lactamases inactivent les  $\beta$ -lactamines en coupant l'anneau  $\beta$ -lactame rendant ainsi l'antibiotique inactif. L'hydrolyse des  $\beta$ -lactamines par les  $\beta$ -lactamases à sérine active se fait par un mécanisme en trois étapes :

La première étape est la formation d'un complexe réversible. Le substrat entre dans le site actif de l'enzyme où il est retenu par des liaisons hydrogène.

La deuxième étape est la formation d'un complexe irréversible, l'acyle-enzyme. L'acylation se produit lors de l'attaque nucléophile du groupement carbonyle de l'anneau  $\beta$ -lactame par le groupement hydroxyle d'une sérine du site actif.

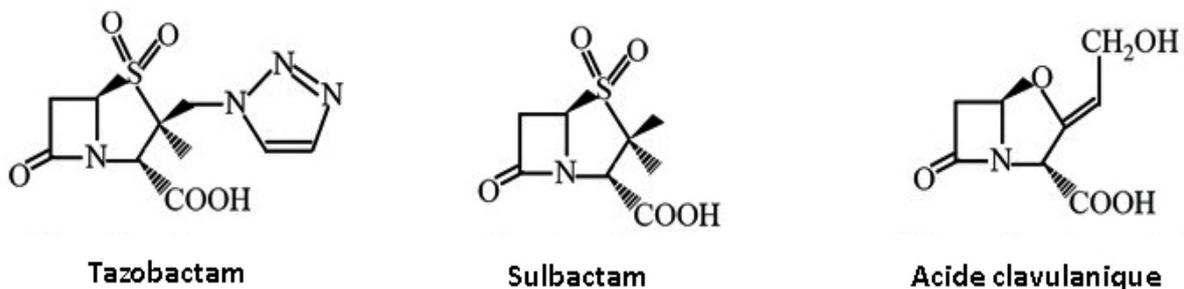
La troisième étape est la libération du substrat devenu un produit inactif, un acide pénicylloïque. L'enzyme est ensuite prête à hydrolyser une autre molécule de  $\beta$ -lactamine. La désacylation nécessite une molécule d'eau comme accepteur final d'électrons (**Minasov *et al.*, 2002 ; Matagne et Frere, 1995 ; Chen et Herzberg, 2000**).

### 3.5. Les inhibiteurs de $\beta$ -lactamases

Afin de prévenir l'hydrolyse des  $\beta$ -lactamines, deux approches ont été utilisées. La première utilise la modification de l'antibiotique le rendant insensible à l'action des  $\beta$ -lactamases. La deuxième approche a été l'utilisation d'une combinaison d'un inhibiteur de  $\beta$ -lactamases avec une  $\beta$ -lactamine. Une thérapie avec ce type de combinaison est basée sur l'effet synergique des deux molécules : l'inhibiteur supprime l'activité de la  $\beta$ -lactamase et protège les  $\beta$ -lactamines qui peuvent alors se lier aux PLPs. L'inhibition la plus efficace et la plus spécifique est causée par des molécules ayant des structures analogues aux  $\beta$ -lactamines et dépourvues d'une activité antibactérienne (Sandanayaka et Prashad, 2002).

Les inhibiteurs des  $\beta$ -lactamases se caractérisent par leur mécanisme d'action. Ces analogues structuraux subissent l'étape d'acylation, et en l'absence d'étape de désacylation, ils restent accrochés à l'enzyme formant des complexes très stables (Chaïbi *et al.*, 1999).

Il existe trois inhibiteurs utilisés en clinique : l'acide clavulanique, le sulbactam et le tazobactam. Ces inhibiteurs sont des dérivés de la pénicilline et possèdent un anneau  $\beta$ -lactame avec une chaîne latérale modifiée (Figure 3) (Maiti *et al.*, 2006).



**Figure 3.** Structure chimique des inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases (Maiti *et al.*, 2006).

#### 3.5.1. Acide clavulanique

L'acide clavulanique ou le clavulanate, seul inhibiteur naturel, produit par *Streptomyces clavugerus*. C'est une  $\beta$ -lactamine qui inactive les  $\beta$ -lactamases d'une grande variété de bactéries à Gram négatif et à Gram positif, *in vitro* et *in vivo* (*Staphylococcus*, *Hemophilus*, *E. coli* et *Klebsiella*) (Li et Townsend, 2006). C'est un inhibiteur irréversible agissant sur les  $\beta$ -lactamases intra- et extracellulaires (Finlay *et al.*, 2003).

#### 3.5.2. Sulbactam

Le sulbactam est un inhibiteur semi-synthétique. Il appartient à la classe des sulfo-pénicillines possédant un noyau péname. C'est un inhibiteur irréversible chez plusieurs  $\beta$ -lactamases avec une très faible activité antibactérienne (Maiti *et al.*, 2006).

### 3.5.3. Tazobactam

Le tazobactam est un inactivateur synthétique de  $\beta$ -lactamase possédant une bonne affinité pour les  $\beta$ -lactamases de la classe A et la classe C. Son spectre d'activité inhibitrice est plus large que celui du clavulanate et du sulbactam (Buynak, 2006 ; Coleman, 2006).

## 4. Les flavonoïdes

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires, d'un poids moléculaire élevé. Ils sont largement distribués dans le règne végétal (Haslam, 1993). Les flavonoïdes sont des composés polyphénoliques naturels. Ce sont des pigments, souvent hydrosolubles largement distribués dans le règne végétal. Plus de 6500 flavonoïdes ont été identifiés dont plusieurs sont responsables des couleurs vives des fleurs et des fruits (Hendrich, 2006).

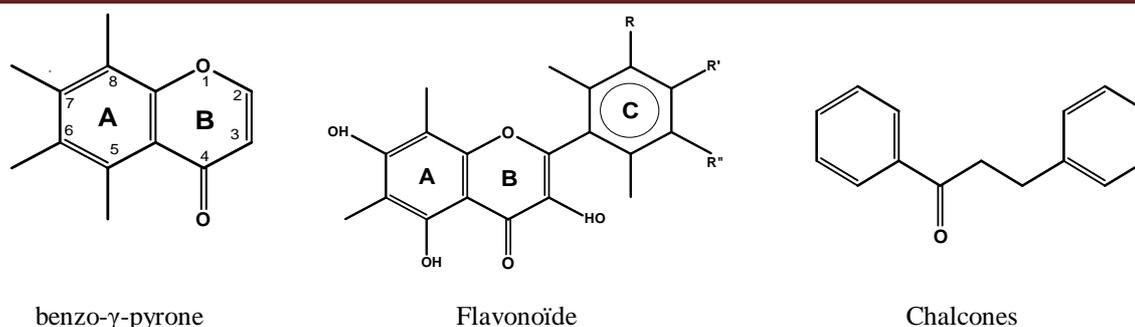
Les flavonoïdes sont présents dans la cuticule foliaire et dans les cellules épidermiques des feuilles assurant ainsi la protection des tissus contre les effets nocifs du rayonnement ultraviolet. Les formes hétérosides des flavonoïdes s'accumulent dans les vacuoles et dans les cellules épidermiques (Bruneton, 1993).

À cause de leur occurrence à beaucoup de plantes mangeables, les flavonoïdes constituent une composante importante dans la majorité des régimes alimentaires quotidiens. Les sources communes de flavonoïdes sont : les oignons, les pommes, les tomates, le vin rouge (quercétine, rutine), le pamplemousse, le thé noir (kaempferol), les graines de soja (genisteine, daidzeine), le persil, le céleri (apigénin) et le thé (catechins) (Hendrich, 2006). Il y'a des flavonoïdes consommés comme des composantes d'aliments, quelques autres sont extraits des plantes immangeables, et appliqués comme des compléments d'aliments, par exemple silibin, qui est extrait du chardon de lait (Fraschini, 2002).

### 4.1. Structure et classification des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des dérivés benzo- $\gamma$ -pyrone (anneaux A et C) (Figure 4). Les flavonoïdes sont subdivisés en 14 classes différentes dont 6 sont les plus répandues et les mieux caractérisés. Ce sont les flavanones, les flavones, les flavanonols, les flavonols, les flavanols et les isoflavones (Heim *et al.*, 2002 ; Hendrich, 2006).

La structure de base de ces molécules est caractérisée par 15 atomes de carbone arrangés en trois cycles. A l'exception des chalcones, ces métabolites secondaires sont toujours tricycliques : deux cycles benzoïques A et B et un hétérocycle C (squelette carboné C6-C3-C6). L'ouverture du cycle oxygéné B caractérise les chalcones (Figure 4) (Pietta, 2000 ; Yao *et al.*, 2004 ; Havsteen, 2002).



**Figure 4.** Structure générale des composés polyphénoliques (Yao *et al.*, 2004).

Dans les flavonoïdes, le deuxième cycle benzène (B) se lie à l'hétérocycle (C) en position 2. Lorsque la liaison s'effectue en position 3, les composés résultants sont appelés iso-flavonoïdes. Les flavonoïdes se distinguent entre eux par les substituants hydroxyles, méthoxyles ou glucidiques sur leurs cycles (Tableau 1) (Das et Rosazza, 2006).

**Tableau 1.** Structure chimique de certains flavonoïdes représentatifs de chaque classe (Heim *et al.*, 2002).

Formule chimique	Nom	substitution									
		3	5	6	7	8	2'	3'	4'	5'	
	Apigénine	H	OH	H	OH	H	H	H	OH	H	
	Flavone	H	H	H	H	H	H	H	H	H	
	diosmine	H	OH	H	sucre	H	H	OH	OCH <sub>3</sub>	H	
	Quercétine	OH	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	
	Fisetine	OH	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	
	Morine	OH	OH	H	OH	H	OH	H	OH	H	
	Myricétine	OH	OH	H	OH	H	H	OH	OH	OH	
	Kaempférol	OH	OH	H	OH	H	H	H	OH	H	
	Gossipyne	OH	OH	H	OH	sucre	H	OH	OH	H	
	Rutine	sucre	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	
	Quercitrine	sucre	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	
Flavanone		Naringénine	H	OH	H	OH	H	H	H	OH	H
Flavanol			Catéchine	OH	OH	H	OH	H	H	OH	OH

L'hétérocycle (C) peut être une pyrone (flavone) ou son dihydrodérivé (flavanone). La fixation d'un groupement hydroxyle (OH) sur le carbone 3 dans les deux cas précédents constitue respectivement les flavonols et les flavanonols (**Bravo *et al.*, 1998**). La substitution de l'un des groupements hydroxyles par un sucre ou un groupement méthyle donne naissance aux flavonoïdes glycosylés et flavonoïdes méthylés (**Yao *et al.*, 2004**).

### 4.2. Activités biologiques des flavonoïdes

Les propriétés des flavonoïdes sont largement étudiées dans le domaine médical où on leur reconnaît des activités anti-virales, antimicrobiennes, anti-tumorales, anti inflammatoires, anti-allergiques et anti-cancéreuses (**Di carlo, 1999**).

#### 4.2.1. Effets antimicrobiens

Certains flavonoïdes ont un rôle de phytoalexines, c'est-à-dire de métabolites que la plante synthétise en grande quantité pour lutter contre une infection causée par des champignons ou par des bactéries (**Harbonne et Williams, 2000**). D'autres flavonoïdes sophoraflavone G et l'epigallocatechin gallate inhibe la synthèse de la membrane cytoplasmique, et que les licochalcones A et C empêchent le métabolisme énergétique de certaines bactéries (**Tim Cushnie et Lamb, 2005**).

#### 4.2.2. Effet antiallergique

Ces effets sont attribués à l'influence des flavonoïdes sur la production de l'histamine. En effet, les flavonoïdes inhibent des enzymes telles que l'AMP cyclique phosphodiesterase et ATPase Ca<sup>2+</sup>-dépendante, responsables de la libération de l'histamine à partir des mastocytes et des basophiles. En inactivant cette enzyme, la quercétine a montré un potentiel d'action supérieur à celui du cromoglycate de sodium utilisé comme médicament en empêchant la libération de l'histamine et d'autres substances endogènes à l'origine de l'asthme (**Di Carlo, 1999 ; Middleton *et al.*, 2000**).

#### 4.2.3. Effets anti-inflammatoires

Sous l'action de la cyclooxygénase et la lipooxygénase, l'acide arachidonique se métabolise respectivement en prostaglandines et leucotriènes induisant ainsi des phénomènes inflammatoires. Landolfi et son groupe ont montré que certains flavonoïdes sont capables de modifier le métabolisme de l'acide arachidonique dans les plaquettes (**Landolfi *et coll.*, 1984**).

## 1. Matériels

### 1.1. Souches bactériennes

Les souches bactériennes *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris* proviennent du laboratoire de bactériologie et de parasitologie de l'hôpital Hakim Saâdane Biskra ont été isolé en 2013 à partir des prélèvements chez des patients hospitalisés dans différents services de l'hôpital. Ces souches sont des BLSE. L'identification des souches a été confirmée au laboratoire au cours d'un travail précédent à l'aide de galeries API-20E (BioMérieux).

### 1.2. Produits

Le milieu de culture Muller Hinton proviennent (Himedia). Les antibiotiques : Amoxicilline / Acide Clavulanique, Céfotaxime, Ampicilline, Tétracycline, Streptomycine, clindamycine, Ceftazidime, Colistine, Gentamicine, Pénicilline, Oxacilline, Céfoxitine , Vancomycine, Acide fusidique (BioMérieux). Disque 6 mm (papier blot Sigma).

Les produits suivants : naringenine, naringenine B, hydroxyflavone, morine, epicatéchine, flavone, acide ellagique, acide caféique, Ouabaïne, chrysin, acide chlorogénique, acide sinapinique, gallate de propyle, acide cinnamique, gallate méthyle, diosmine, rutine, acide gallique, quercétine, naringine, catéchine, pirenzepine ont été obtenus de Sigma Aldrich.

## 2. Méthodes

L'activité antimicrobienne des différents molécules pure, obtenus a été déterminée sur plusieurs souches bactériennes en utilisant la méthode des disques, son principe est basé sur la diffusion des substances testées du disque vers le milieu de culture solide. Une suspension bactérienne d'une opacité de 0.5 Mc Farland (absorbance de 0.08-0.1 à 625 nm) est préparée à partir d'une culture jeune (18 heures). Un inoculum de cette suspension estensemencé sur des boites de pétri contenant la gélose Mueller Hinton. L'ensemencement est effectué par écouvillonnage, le frottement de l'écouvillon sur la même boite de pétri a été répété à trois reprises en tournant à chaque fois la boite d'un angle de 60°. Une fois l'ensemencement est effectué, des disques de 6 mm de diamètre sont déposés sur la surface de la géloseensemencée et imprégnés de 10 µl de l'extrait (100 mg/ml). Deux autres disques imprégnés avec de l'eau distillée et le DMSO sont utilisés comme contrôle négatif. Après une incubation de 24 heures à 37°C, les diamètres des zones d'inhibition produites par les extraits étudiés sont mesurés, plus le

diamètre d'inhibition est grand, plus l'activité antimicrobienne est importante. La combinaison des antibiotiques et des flavonoïdes est une nouvelle stratégie potentielle de développement d'une nouvelle thérapie. Il s'agit du même protocole, seulement les disques des antibiotiques sont imprégnés avec 10  $\mu$ l d'extraits des flavonoïdes (**Rahal, 2005**).

## 1. Antibiogramme

Un test de 12 antibiotiques a été fait sur *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris* (des bactéries à Gram négatif de la famille des *Enterobacteriaceae*) par méthode de diffusion sur disques (**Tableau 2**). On a obtenu des zones d'inhibition de 5 antibiotiques sur les bactéries étudiées qui sont : Acide clavulanique, colistine, gentamicine, céfotaxime et céfoxitine sauf que l'antibiotique streptomycine qui en plus actif sur le *Proteus vulgaris*.

**Tableau 2.** Les diamètres des zones d'inhibition (mm) *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *Proteus vulgaris* provoquées par les antibiotiques.

Antibiotique	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
Amoxicilline + Ac.Clavulanique	14.5	24	17.5
Céfotaxime	10	12	15.5
Ampicilline	0	0	0
Tétracycline	0	0	0
Streptomycine	0	0	12.5
Clindamycine	0	0	0
Ceftazidime	0	0	0
Colistine	12.75	16.25	10
Acide fusidique	0	0	0
Gentamicine	24	19.75	25
Pénicilline	0	0	0
Oxacilline	0	0	0
Céfoxitine	26.25	30.5	25.5
Vancomycine	0	0	0

### 1. L'effet anti bactérienne des flavonoïdes

On a 22 flavonoïdes qui ont été testés sur les même souches dont 15 sont actifs sur *Escherichia coli*, 06 sur *Klebsiella pneumoniae* et 05 sur le *Proteus vulgaris*. Le test prouve que les flavonoïdes ont une activité anti bactérienne qui peut être forte, intermédiaire ou faible. D'après ces résultats, nous pouvons tirer les renseignements suivants : les flavonoïdes : naringenine B, acide chlorogénique, flavone, acide sinapinique, gallate de propyle, acide cinnamique sont les biomolécules les plus active. Les flavonoïdes : Ouabaïne, epicatéchine, naringine et Catéchine ont des faibles activités (**Tableau 3**).

**Tableau 3.** Les diamètres des zones d'inhibition (mm) *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *Proteus vulgaris* provoquées par les biomolécules.

Molécules	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
Naringenine	6.5	0	0
Naringenine B	9.75	7.75	7.75
Hydroxyflavone	0	0	0
Morine	0	0	0
Epicatéchine	8.25	0	0
Flavone	9.5	7	0
Acide ellagique	0	0	9.75
Acide caféique	10	0	0
Ouabaïne	9	0	0
chrysin	0	0	0
Acide Chlorogénique	8.75	0	0
Acide Sinapinique	8.25	8.75	7.25
Gallate de propyle	18.75	10	11.75
Acide cinnamique	9.75	8.75	7.75
Gallate méthyle	0	0	0
Diosmine	0	0	0
Rutine	9.25	0	0
Acide gallique	8	8	0
Quercétine	0	0	0
Naringine	9	0	0
Catéchine	10	0	0
Pirenzepine	9.5	0	0

Afin d'établir une relation entre les structures chimiques des flavonoïdes et leur activité inhibitrice, nous avons comparé la structure et l'activité pour chaque molécule. En comparant les flavonoïdes actifs avec l'acide clavulanique, tazobactam et sulbactam, on trouve une analogie structurale au niveau du groupement 4-oxo. On peut supposer que cette fonction est essentielle pour l'inhibition. Cette fonction est présente chez l'ensemble des flavonoïdes qui ont une activité importante. Cependant, la catéchine, qui n'a pas cette fonction, présente un effet plus au moins remarquable.

La position des hydroxyles (-OH) est sans doute responsable de l'activité. L'absence de l'OH en C3' diminue l'activité c'est le cas de la naringénine B et la Catéchine. D'autre part, l'importance des hydroxyles en positions C5 et C7 dans le cas confirmé par la naringine qui a un OH absent en C5 et occupé en C7 elle devient plus faible. La fonction 4-oxo du cycle C a une importance. Si on compare la catéchine et la quercétine. La présence de cette fonction a une importance.

D'autres interprétations peuvent être dégagées : le cycle A n'a pas d'influence sur le type d'inhibition. En observant l'activité de la naringénine B et la Catéchine on peut conclure que l'hydroxyle C3 augmente l'effet.

### 2. Le couplage des flavonoïdes -Antibiotiques

Le terme synergie signifie travailler ensemble. Il désigne l'interaction entre au moins deux « choses » dont les effets combinés sont beaucoup plus supérieurs à la somme de leurs effets singuliers effets de type « un plus un est supérieur à deux ». En plus du terme synergie, d'autres termes sont utilisés pour désigner les interactions entre deux molécules :

**Effet additif** : phénomène qui survient lorsque l'effet combiné d'au moins deux produits chimiques est égal à la somme des effets de chaque produit chimique pris individuellement (aucune interaction directe).

**Potentialisation** : phénomène qui survient lorsqu'une substance qui n'a habituellement pas un effet est combinée à un produit chimique, ce qui a pour effet de rendre ce dernier beaucoup plus efficace.

**Antagonisme** : ce phénomène est le contraire de la synergie. Il survient lorsque l'effet combiné d'au moins deux composés est moins efficace que les effets individuels des substances.

On fait un couplage entre les flavonoïdes et les antibiotiques qui sont les deux actifs sur *Escherichia coli*. On a remarqué que les 3 antibiotiques : AMC, FOX et CTX dont le couplage les flavonoïdes renforce l'activité antibactérienne par exemple (AMC+NaringénineB) et (FOX+ Gallate de propyle).

Tous les flavonoïdes testés sur *Escherichia coli* en suite couplés avec le GEN ont inhibé l'activité antibactérienne de l'antibiotique. Par contre on a un renforcement remarquable de l'activité antibactérienne après le couplage avec le COL (**Tableau 4**).

**Tableau 4.** Les diamètres des zones d'inhibition (mm) d'*Escherichia coli* provoquées par les flavonoïdes et les antibiotiques.

<b>Antibiotique</b>	<b>AMC</b>	<b>CTX</b>	<b>FOX</b>	<b>GEN</b>	<b>COL</b>
	<b>(14.5)</b>	<b>(10)</b>	<b>(26.25)</b>	<b>(24)</b>	<b>(12.75)</b>
Naringenine B	20.75	9.75	20.5	21.75	14.75
Epicatechine	9.75	8.5	25	21.5	14.75
Flavone	13	9	26.75	21.5	14.5
Acide caféique	11	8	23.25	21	14.25
Ouabaine	11.75	9.75	24.75	21.25	14.75
Acide Chlorogénique	10.5	10.25	22.75	21.75	14.5
Acide Sinapinique	10	9.5	19.25	21.75	14.75
Gallate de propyle	10.75	12.25	11	22	14.5
Acide cinnamique	11.5	9.75	19	21	14.75
Rutine	12.5	10.5	21.75	21.25	15
Acide gallique	10.75	11	26	21.5	14
Naringine	11.75	11	25.5	22.5	14.5
Catéchine	11	10.25	26	22	15
Pirenzepine	11	11.25	26.5	22	14.75

Le couplage des flavonoïdes avec antibiotiques sur *Klebsiella pneumoniae* (**Tableau 5**) renforce très faiblement l'activité antibactérienne ou l'inhibe complètement par exemple (AMC+ Gallate de propyle).

**Tableau 5.** Les diamètres des zones d'inhibition (mm) de *Klebsiella pneumoniae* provoquées par les flavonoïdes et les antibiotiques.

<b>Antibiotique</b>	<b>AMC</b>	<b>CTX</b>	<b>FOX</b>	<b>GEN</b>	<b>COL</b>
	<b>(24)</b>	<b>(12)</b>	<b>(30.5)</b>	<b>(19.75)</b>	<b>(16.25)</b>
Naringenine B	24	10	30.25	20	14.5
Acide Sinapinique	23.25	8.75	28.25	19	17.75
Gallate de propyle	14.25	12.5	30	21.75	16.75
Acide cinnamique	23	10.75	29.25	20	15
Acide gallique	22.75	13.75	28.75	19.25	15.25

Le couplage des flavonoïdes avec antibiotiques sur *Proteus vulgaris* renforce fortement l'activité antibactérienne pour CTX, GEN et le FOX de façon plus faible pour AMC. Le gallate de propyle inhibe toujours de façons très importantes l'AMC (**Tableau 6**).

**Tableau 6.** Les diamètres des zones d'inhibition (mm) de *Proteus vulgaris* provoquées par les flavonoïdes et les antibiotiques.

<b>Antibiotique</b>	<b>S</b> <b>(12.5)</b>	<b>AMC</b> <b>(17.5)</b>	<b>CTX</b> <b>(15.5)</b>	<b>FOX</b> <b>(25.5)</b>	<b>GEN</b> <b>(25)</b>
Naringenine B	9.75	18.25	36.25	29.75	34.75
Acide ellagique	8	17.75	35.5	32.25	34.75
Acide Sinapinique	14.75	18.75	36.75	31	35.25
Gallate de propyle	13	14.25	35.25	29.5	35.25
Acide cinnamique	11	20.5	38.25	31	36.5

### CONCLUSION

Dans ce travail toutes l'expérience faites pour connaitre l'activité antibactérienne des flavonoïdes et leur pouvoir d'inhibition contre les bactéries mutantes qui secret l'enzyme  $\beta$ -lactames qui hydrolyse le noyau  $\beta$ -lactamine, présent le principalement des antibiotiques utilisé contre les infections.

On a testé 3 souches bactériennes BLSE isolées du prélèvement des malades hospitalisés dans différents services. Les trois étapes effectuées sont : la méthode de diffusion par disque, ont testé les 3 germes avec les flavonoïdes et on a trouvé que ces derniers on le pouvoir d'inhibition de l'activité bactérienne, le même est testé avec les antibiotiques.

La troisième étape a consiste à déterminer les caractéristiques des flavonoïdes en les couplant avec les antibiotiques et on a montré qu'il un effet synergique des certaines flavonoïdes avec certaines antibiotiques en plus on a trouvé une inhibition des certaines antibiotiques par flavonoïdes.

On conclu que les flavonoïdes peuvent être une alternative pour traiter certaines infection bactériennes sans effets secondaires puisque ils sont des composés naturels trouvés dans notre alimentations et moins chères que les antibiotiques.

## Résumé

Cette étude a été effectuée sur trois souches bactériennes qui produisent une enzyme  $\beta$ -lactamase, les germes BLSE sont les plus fréquents dans les infections bactériennes.

Ce travail a consisté à tester les flavonoïdes pour déterminer leur activité antibactérienne comme : naringenine B, acide chlorogénique, flavone, acide sinapinique .sont des inhibiteurs d'activité bactérienne avec efficacité contrairement aux diosmine qui n'ont aucun effet antibactérien.

Mais il ya des flavonoïdes qui inhibent l'antibiotique comme gallte porpyle. On Peut déduire que le type cycle et la position du OH interviennent dans l'inhibition de l'activité bactérienne.

Les flavonoïdes ont un rôle non négligeable dans le traitement des infections bactériennes d'où l'intérêt d'approfondir les études dans ce domaine.

**Mots –clés** : flavonoïdes,  $\beta$ -lactamase, infections bactériennes, antibiotique, l'activité bactérienne.

---

## Abstract

This study was performed on three bacterial strains which produce  $\beta$ -lactamase enzyme, BLSE germs are most common in bacterial infections.

This work was a test flavonoids to determine their antibacterial activity as: B naringenin, chlorogenic acid, flavone, sinapinic acid. are inhibitors of bacterial activity effectively unlike diosmin with no anti bacterial effect. But there are flavonoids that inhibit antibiotica galle porpyle. It is possible to deduce that the ring type and position of the OH involved in the inhibition of bacterial activity. Flavonoids have a significant role in the treatment of bacterial infections hence the interest for further study in this area.

**Keywords:** flavonoids,  $\beta$ -lactamase, bacterial infections, antibiotic, bacterial activity.

---

## الملخص

قد أجريت هذه الدراسة على 3 سلالات بكتيرية المفززة  $\beta$ -لاكتاماز وتعتبر بيكتيريا BLSE من اشهر البكتيريا المسببة للعدوى . وكان هذا العمل اختبار الفلافونيد لتحديد نشاطهم المضاد للبكتيريا مثل :نارينجين B ، وحمض الكلوروجينيك، فلافون، وحمض sinapinic هي مثبتات النشاط البكتيري فعلا على عكس diosmin عدم وجود تأثير مضاد البكتيرية .

ولكن هناك مركبات الفلافونويد التي تثبط مضادات الحيوية كما gallte porpyle . يمكن أن نستنتج أن نوع الحلقة وموقع OH يشاركون في تثبيط النشاط البكتيري. مركبات الفلافونويدات لها دور كبير في علاج الالتهابات البكتيرية والمساهمة في مزيد من الدراسات في هذا المجال.

**الكلمات الرئيسية:** الفلافونويد،  $\beta$ -لاكتاماز، والالتهابات البكتيرية، والمضادات الحيوية، والنشاط البكتيري.