

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
*Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique*

*Université A.MIRA de Bejaia*  
*Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie*  
*Département de Biologie Physico-Chimique*

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de*

**Magister**  
**En Biologie**  
*Option : Biologie Moléculaire*

***Thème***

**Effet des alcaloïdes de deux espèces de *Fumaria* sur des bactéries  
multirésistantes d'origine hospitalière.**

**Par :**

**Mr BRIBI Nouredine**

***Devant le jury :***

<b>Président :</b>	<b>Mr B. SAIDANI</b>	(Pr, Université de Bejaia)
<b>Promoteur :</b>	<b>Mme F. BENABDESSELAM</b>	(M.C, Université de Bejaia)
<b>Co-promoteur :</b>	<b>Mr A. TOUATI</b>	(M.C, Université de Bejaia)
<b>Examineurs :</b>	<b>Mr M. IGUEROUADA</b>	(M.C, Université de Bejaia)
	<b>Mr K. BELHAMEL</b>	(M.C, Université de Bejaia)

**2009**

## *Remerciements*

*J'exprime d'abord mes profonds remerciements et ma vive reconnaissance à Madame BENABDESSELAM, Maitre de conférences à l'université A. MIRA de Bejaia, pour avoir accepté de m'encadrer. Qu'elle trouve ici mes sentiments de gratitude et de déférence.*

*Je tiens également à exprimer toute ma reconnaissance à Monsieur TOUATI, Maitre de conférences à l'université A. MIRA de Bejaia, pour son aide morale et technique tout au long de ce travail, ainsi que pour ses conseils. Qu'il trouve ici ma respectueuse admiration et ma reconnaissance.*

*Je remercie Monsieur SAIDANI, Professeur à l'université A. MIRA de Bejaia, de m'avoir fait le grand honneur d'assurer la présidence du jury.*

*Mes vifs remerciements vont aussi à Monsieur IGUEROUADA, Maitre de conférences à l'université A. MIRA de Bejaia, ainsi que Monsieur BELHAMEL, Maitre de conférences à l'université A. MIRA de Bejaia, pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Je tiens également à remercier tous ceux et celles qui m'ont aidé de près ou de loin à avancer.*

## *Dédicace*

*A ma mère et mon père*

*A ma fiancée*

*A mes frères et sœurs*

*A mes amis*

*A Baouse*

## *Liste des figures*

<b>Figure N°1</b> : Ouverture du noyau $\beta$ -lactame par les DD-peptidases et les $\beta$ -lactamases .....	7
<b>Figure N°2</b> : Enveloppe d'une bactérie à Gram-, <i>Escherichia coli</i> .....	10
<b>Figure N°3</b> : Structure des hétérocycles constituant le noyau de base des alcaloïdes .....	17
<b>Figure N°4</b> : Biosynthèse ds alcaloïdes .....	19
<b>Figure N°5</b> : Biogenèse des principaux alcaloïdes isoquinoléiques .....	21
<b>Figure N°6</b> : Structure chimique de quelques alcaloïdes isoquinoléiques présents chez le genre <i>Fumaria</i> .....	23
<b>Figure N°7</b> : Photographie de <i>Fumaria capreolata</i> .....	26
<b>Figure N°8</b> : Photographie de <i>Fumaria bastardi</i> .....	27
<b>Figure N°9</b> : Montage d'extraction .....	29
<b>Figure N°10</b> : Protocole d'extraction des alcaloïdes totaux des parties aériennes de <i>Fumaria bastardii</i> et <i>Fumaria capreolata</i> .....	30
<b>Figure N°11</b> : Précipité orangé des alcaloïdes.....	36
<b>Figure N°12</b> : Diamètres des zones d'inhibition obtenus par la méthode des disques et la méthode des puits.....	39
<b>Figure N°13</b> : Diamètres des zones d'inhibition obtenus par la méthode des disques et la méthode des puits en fonction des deux espèces de <i>Fumaria</i> .....	39
<b>Figure N°14</b> :Effet des différentes dilutions des solutions d'alcaloïdes sur l'activité antibactérienne	40
<b>Figure N°15</b> : Diamètres d'inhibition en fonction des concentrations d'alcaloïdes des deux espèces de <i>Fumaria</i> obtenus avec <i>S. aureus</i> S56.....	41
<b>Figure N°16</b> : Zones d'inhibition observées en présence des alcaloïdes des deux espèces de <i>Fumaria</i> obtenues avec <i>S. aureus</i> S56 .....	42
<b>Figure N°17</b> : Diamètres d'inhibition en fonction des concentrations d'alcaloïdes des deux espèces de <i>Fumaria</i> obtenus avec <i>K. pneumoniae</i> E47 .....	43
<b>Figure N°18</b> : Zones d'inhibition observées en présence des alcaloïdes des deux espèces de <i>Fumaria</i> obtenues avec <i>K. pneumoniae</i> E47 .....	43
<b>Figure N°19</b> : Diamètres d'inhibition en fonction des concentrations d'alcaloïdes des deux espèces de <i>Fumaria</i> obtenus avec <i>P. aeruginosa</i> 604 .....	45
<b>Figure N°20</b> : Zones d'inhibition observées en présence des alcaloïdes des deux espèces de <i>Fumaria</i> obtenues avec <i>P. aeruginosa</i> 604.....	45

<b>Figure N°21:</b> Diamètres d'inhibition en fonction des concentrations d'alcaloïdes des deux espèces de <i>Fumaria</i> obtenus avec <i>E.coli</i> .....	<b>47</b>
<b>Figure N°22:</b> Zones d'inhibition observées en présence des alcaloïdes des deux espèces de <i>Fumaria</i> obtenues avec <i>E. coli</i> .....	<b>47</b>
<b>Figure N°23:</b> Activité antibactérienne des alcaloïdes des deux espèces de <i>Fumaria</i> sur les quatre souches testées (méthode des disques) .....	<b>48</b>
<b>Figures N°24:</b> Effet de synergie entre les alcaloïdes des deux plantes sur <i>K. pneumoniae</i> E47 .....	<b>51</b>
<b>Figures N°25:</b> Effet de synergie entre les alcaloïdes des deux plantes sur <i>P. aeruginosa</i> 604 .....	<b>51</b>

### *Liste des tableaux*

<b>Tableau N°I</b> : Principaux mécanismes de la résistance bactérienne .....	<b>5</b>
<b>Tableau N°II</b> : Principaux groupes d'alcaloïdes isoquinoléiques .....	<b>20</b>
<b>Tableau N°III</b> : Les alcaloïdes de certaines espèces de <i>Fumaria</i> .....	<b>22</b>
<b>Tableau N°IV</b> : Caractéristiques morphologiques de <i>F. capreolata</i> .....	<b>25</b>
<b>Tableau N°V</b> : Caractéristiques morphologiques de <i>F. bastardi</i> .....	<b>26</b>
<b>Tableau N°VI</b> : Gamme de concentration des alcaloïdes de <i>F. bastardii</i> et <i>F. capreolata</i> ....	<b>31</b>
<b>Tableau N°VII</b> : Souches bactériennes résistantes aux antibiotiques testées .....	<b>32</b>
<b>Tableau N°VIII</b> : Rendement en alcaloïdes totaux de <i>F. bastardii</i> et <i>F. capreolata</i> .....	<b>35</b>
<b>Tableau N°IX</b> : Activité antibactérienne des alcaloïdes de <i>F. bastardii</i> et de <i>F. capreolata</i> (Méthode des puits) sur les quatre souches résistantes aux antibiotiques .....	<b>37</b>
<b>Tableau N°X</b> : Activité antibactérienne des alcaloïdes de <i>F. bastardii</i> et de <i>F. capreolata</i> (Méthode des disques) sur les quatre souches résistantes aux antibiotiques .....	<b>38</b>
<b>Tableau N°XI</b> : Synergie entre les alcaloïdes de <i>F. bastardii</i> et SXT .....	<b>50</b>
<b>Tableau N°XII</b> : Synergie entre les alcaloïdes de <i>F. capreolata</i> et SXT .....	<b>50</b>

### ***Liste des abréviations***

- ADN** : Acide désoxyribonucléique
- ATP** : Adénosine triphosphate
- BLSE** :  $\beta$ -lactamase à spectre élargie
- DMSO**: Dimethylsulfoxyde
- DO**: Densité optique
- D<sub>x</sub>** : Dilution
- Eau (d)** : Eau distillée
- IMP** : Imipénème
- LCR** : Liquide céphalorachidien
- Me OH** : Méthanol
- PLP** : Protéines Liant les Pénicillines
- RDRQ** : Région déterminante pour la résistance aux quinolones
- SARM** : *Staphylococcus aureus* résistance à la méticilline
- SM** : Solution mère
- SXT**: Trimethoprim-Sulfaméthoxazole

## Sommaire

*Liste des figures*

*Liste des tableaux*

*Liste des abréviations*

**Introduction..... 1**

### **Chapitre I Synthèse bibliographique**

<b>I-La résistance bactérienne aux antibiotiques.....</b>	<b>2</b>
<b>I-1 Support génétique de la résistance.....</b>	<b>3</b>
I-1-1 Mutation.....	3
I-1-2 Acquisition de gènes.....	4
<b>I-2 Mécanismes biochimiques de la résistance.....</b>	<b>4</b>
I-2-1 Résistance par inactivation enzymatique de l'antibiotique.....	5
I-2-2 Résistance par modification de la cible de l'antibiotique.....	8
I-2-3 Résistance par imperméabilité et efflux actif de l'antibiotique.....	9
<b>II- Les substances bioactives de <i>Fumaria</i>.....</b>	<b>13</b>
II-1 Classification botanique des Fumariacées.....	14
II-2 Les alcaloïdes.....	15
II-2-1 Distribution et localisation des alcaloïdes.....	16
II-2-2 Classification des alcaloïdes.....	17
II-2-3 Biosynthèse des alcaloïdes.....	18
II-2-3-1 Biosynthèse des alcaloïdes isoquinoléiques.....	20
II-2-4 Les alcaloïdes de <i>Fumaria</i> .....	22
II-2-5 Action pharmacologique des alcaloïdes.....	24

### **Chapitre II Matériel et méthodes**

<b>I Le matériel végétal.....</b>	<b>25</b>
I-1 Description botanique de <i>Fumaria capreolata</i> .....	25
I-2 Description botanique de <i>Fumaria bastardii</i> .....	26
<b>II- Méthodes.....</b>	<b>28</b>
II-1 Séchage.....	28



II-2-1 Broyage et tamisage.....	28
II-3 Extraction des alcaloïdes.....	29
II-4 Test phytochimique.....	31
II-5 Préparation de la gamme de concentration des alcaloïdes.....	31
II-6 Evaluation de l'activité antibactérienne.....	32
II-6-1 La méthode des disques.....	32
II-6-2 La méthode des puits.....	33
II-7 Test de synergie entre les alcaloïdes et SXT.....	33
II-7-1 Test de synergie sur <i>K. pneumoniae</i> E47.....	33
II-7-2 Test de synergie sur <i>P. aeruginosa</i> 604.....	34

### ***Chapitre III Résultats et discussions***

1- Collecte et taux d'extraction.....	35
2- Taux d'extraction des alcaloïdes.....	35
3- Activité antibactérienne des alcaloïdes.....	37
3-1 Activité des alcaloïdes de <i>F. bastardii</i> et de <i>F. capreolata</i> sur <i>S. aureus</i> S56.....	41
3-2 Activité des alcaloïdes de <i>F.bastardii</i> et de <i>F. capreolata</i> sur <i>K. pneumoniae</i> E47....	43
3-3 Activité des alcaloïdes de <i>F.bastardii</i> et de <i>F. capreolata</i> sur <i>P .aeruginosa</i> 604.....	44
3-4 Activité des alcaloïdes de <i>F.bastardii</i> et de <i>F. capreolata</i> sur <i>E. coli</i> .....	46
4- Etude comparative de la sensibilité des quatre souches bactériennes.....	48
5-Test de synergie.....	50

<b><i>Conclusion et perspectives</i></b> .....	<b>53</b>
--	-----------

***References bibliographiques***

***Glossaire***

***Annexe***

# *Introduction*

## *Introduction*

La résistance des bactéries aux antibiotiques pose de graves problèmes, surtout dans le domaine médical et plus particulièrement en milieu hospitalier où la majorité des souches isolées présentent des résistances. Depuis la fin de la seconde guerre mondiale, la résistance aux antibiotiques apparaît comme une évolution inéluctable. Les bactéries pathogènes retrouvées en milieu hospitalier appartiennent à différentes familles bactériennes. Ces pathogènes sont essentiellement des germes hospitaliers à l'origine d'infection nosocomiales. Présents dans l'environnement hospitalier, au niveau des individus (patients, personnel soignant) ou dans l'environnement inanimé (surfaces, instruments, solutés), ils sont sélectionnés du fait de leur capacité à résister facilement aux antibiotiques.

L'utilisation des plantes pour se soigner date de la préhistoire et tous les peuples sur tous les continents ont cette vieille tradition. Malgré les efforts des chimistes synthèse de nouvelles molécules, plus de 25 % des médicaments prescrits dans les pays développés dérivent directement ou indirectement des plantes ( 1). Les connaissances empiriques accumulées depuis des milliers d'années ont permis la sélection de plantes pour soigner diverses maladies. Certains de ces usages anciens sont aujourd'hui vérifiés par des études scientifiques et ont conduit à l'isolement de nouveaux principes actifs et à la mise sur le marché de nouveaux médicaments à base de plantes ou d'extraits standardisés. Cependant, en tant que sources de médicaments, les plantes restent encore sous exploitées surtout dans le domaine de la microbiologie médicale (2).

Il est certain que la plupart des antibiotiques prescrits dérivent des microorganismes, mais il est aussi évident que les agents antimicrobiens d'origine végétale ont leur place dans l'arsenal thérapeutique. Dans le but de trouver de nouvelles activités antibactériennes, les alcaloïdes de deux espèces de *Fumaria*, ont été extraits et testés sur quatre souches bactériennes résistantes aux antibiotiques d'origine hospitalière.

*Chapitre I*  
*Synthèse bibliographique*

*La résistance bactérienne aux  
antibiotiques*

## **I- La résistance bactérienne aux antibiotiques**

L'apparition des premiers antibiotiques a pu faire espérer que le traitement des maladies infectieuses était résolu. Par la suite la gamme des antibiotiques s'est tellement enrichie qu'elle a fait naître un faux sentiment de sécurité. Mais les phénomènes de résistance ont émergé et ces dernières années une prise de conscience générale de la dimension mondiale de la résistance se fait jour. La médecine est aujourd'hui confrontée à des problèmes de thérapie anti-infectieuse qui pourraient se révéler très graves dans un proche avenir. Cette résistance est un facteur majeur compliquant le traitement des infections bactériennes et favorisant la dissémination des souches multirésistantes (Jarlier, 2000).

La résistance bactérienne aux antibiotiques se caractérise par son caractère naturel ou acquis, son mécanisme et son support génétique. La résistance naturelle est une insensibilité aux antibiotiques, existant naturellement chez tous les membres d'un genre ou d'une espèce bactérienne. Elle fait partie du patrimoine génétique normal du germe (c'est le cas par exemple de la résistance naturelle des Klebsielles aux aminopénicillines par la synthèse d'une pénicillinase constitutive), cette résistance est un phénomène connu, constant, transmissible à la descendance aux cours des divisions successives. En revanche, certaines souches, au sein d'une espèce naturellement sensible à l'antibiotique, deviennent résistantes par l'acquisition de nouveaux gènes capables de rendre la bactérie insensible à un antibiotique ou un groupe d'antibiotiques. Ce nouveau gène peut être obtenu soit par mutation au niveau du chromosome, phénomène rare, soit par transfert d'ADN de plasmides conjugatifs ou de transposons (Yala *et al*, 2001., Levy, 2005).

D'une manière générale, les mécanismes impliqués dans la résistance acquise sont mieux connus que ceux impliqués dans la résistance naturelle car il est plus facile de trouver l'explication d'un caractère acquis, différence ponctuelle entre une souche devenue résistante à un antibiotique et la souche originelle sensible, que d'un caractère naturel qui est permanent chez une espèce et pour lequel on manque d'éléments de comparaison (Jarlier, 2000).

## **I-1 Support génétique de la résistance**

La connaissance des bases de la génétique moléculaire bactérienne permet de mieux comprendre la sélection et la dissémination des résistances, et par là de mieux lutter contre les problèmes, qui en découlent. Les gènes qui codent pour les mécanismes de résistance peuvent faire partie du patrimoine chromosomique de la bactérie (modification de l'information génétique par mutation chromosomique), ou par l'acquisition de matériel génétique extrachromosomique par des éléments mobiles transférables, plasmides et transposons présents chez d'autres espèces (Yala *et al*, 2001).

La résistance naturelle a comme support génétique le chromosome bactérien. Les mécanismes impliqués sont le plus souvent un défaut de pénétration intracellulaire ou l'inactivation par des systèmes enzymatiques bactériens. Les événements génétiques impliqués dans la résistance acquise peuvent être des mutations affectant des gènes naturellement présents sur le chromosome et, dans ce cas, le mécanisme est le plus souvent une modification de la cible de l'antibiotique dont l'affinité est alors diminuée, ou plus rarement une diminution de la pénétration intrabactérienne ou l'inactivation de l'antibiotique (Jarlier, 2000., Yala *et al*, 2001., Levy, 2005).

### **I-1-1 Mutation**

La mutation apparaît sur un gène porté naturellement par le chromosome, impliqué dans le mode d'action de l'antibiotique. C'est un phénomène rare qui ne concerne que 10 % des souches pathogènes isolées. Une mutation n'affecte qu'un seul caractère. Elle est spontanée, spécifique, stable et indépendante. La fréquence d'apparition d'une mutation sélectionnée par l'antibiotique est de l'ordre de  $10^{-6}$  à  $10^{-9}$  selon les bactéries et les caractères considérés. La probabilité d'obtenir par mutation des bactéries résistantes à deux antibiotiques est égale au produit de chacune des mutations considérées indépendamment, ce qui justifie l'association d'antibiotiques pour prévenir l'émergence de mutants résistants. Ainsi, le traitement de la tuberculose nécessite une quadrithérapie. Cependant, dans certains cas, une mutation peut être à l'origine d'une résistance à plusieurs antibiotiques de familles différentes. Ce phénomène est décrit pour certaines entérobactéries chez lesquelles une mutation modifie les porines qui deviennent imperméables aux antibiotiques pénétrant par cette voie (Jarlier, 2000., Levy, 2005).

### **I-1-2 Acquisition de gènes**

Une bactérie acquiert un ou plusieurs gènes étrangers par transfert génétique horizontal. Trois mécanismes connus (transformation, transduction, conjugaison) permettant une diffusion rapide et étendue des informations génétiques chez les bactéries à Gram+ et à Gram-, le transfert de l'ADN d'une bactérie donatrice à une bactérie réceptrice par conjugaison est décrit chez la quasi-totalité des espèces et est vraisemblablement le plus courant. Le transfert dans la cellule réceptrice d'un des deux brins de l'ADN de la séquence est suivi de la synthèse du brin complémentaire dans chaque cellule de sorte qu'à l'issue de la conjugaison, chaque bactérie possède l'ADN double brin porteur de l'information génétique. Les gènes transférables sont la plupart du temps portés par des plasmides ou des transposons. Une bactérie peut héberger plusieurs plasmides de résistance aux antibiotiques de familles différentes. L'acquisition d'un tel plasmide par une bactérie sensible lui permet de devenir multirésistante en une seule étape. Le mode de répllication autonome des plasmides et leur transfert entre bactéries même différentes sur le plan taxonomique explique le caractère épidémique de la transmission de ce type de résistance (Jarlier, 2000., Yala *et al*, 2001).

### **I-2 Mécanismes biochimiques de la résistance**

Pour qu'un antibiotique soit actif, un certain nombre de conditions doivent être remplies : il doit en premier lieu, pénétrer dans la cellule, il doit ensuite rencontrer le récepteur ou la cible moléculaire de son action pour la modifier ou la perturber ; enfin, au cours de son contact avec la cellule, il ne doit subir aucune transformation susceptible de l'inactiver. Les bactéries ont cependant développé des mécanismes de résistances efficaces reposant sur différents facteurs génétiquement indépendants, à savoir une modification de la cible moléculaire d'action de l'antibiotique, la production d'enzymes qui catalysent l'inactivation de l'antibiotique, un défaut de pénétration de l'antibiotique dans la bactérie, des phénomènes d'efflux actif expulsant activement l'antibiotique hors de la cellule bactérienne (tableau I) (Coleman *et al*, 1994., Charlier *et al*, 1998).



**Tableau N°I** : Principaux mécanismes de la résistance bactérienne (Coleman *et al*, 1994).

Mécanismes de résistance	Exemples d'antibiotiques
1- Inactivation enzymatique	$\beta$ -lactamines, aminosides, fosfomycine, chloramphénicol.
2- Modification de la cible	$\beta$ -lactamines, rifampicine, quinolones, aminosides, glycopeptides, macrolides.
3- Imperméabilité et efflux actif	$\beta$ -lactamines, quinolones, tétracyclines, aminosides, macrolides.

### I-2-1 Résistance par inactivation enzymatique de l'antibiotique

C'est le mécanisme le mieux connu, avant que l'antibiotique ne puisse atteindre la cible, il est inactivé ou détruit par des enzymes bactériennes. A part quelques espèces comme *salmonella*, *Shigella*, et *Escherichia coli*, les entérobactéries, dont la plupart sont saprophytes, de même que les *pseudomonas*, sont naturellement résistants aux pénicillines et certaines céphalosporines. Chez *Klebsiella pneumoniae*, la résistance est liée à la production constitutive d'une  $\beta$ -lactamase chromosomique à spectre large, qui entraîne la résistance aux pénicillines, levée par des inhibiteurs enzymatiques comme l'acide clavulanique. Chez *Pseudomonas aeruginosa*, la résistance est liée à la production d'une  $\beta$ -lactamase chromosomique de type céphalosporinase. Cette enzyme est produite sur un mode inductible c'est-à-dire que sa production augmente en présence de  $\beta$ -lactamine, puis diminue lorsque la  $\beta$ -lactamine n'est plus présente. Elle entraîne la résistance naturelle aux  $\beta$ -lactamines qui sont à la fois de bons inducteurs et de bons substrats pour l'enzyme alors produite en grande quantité. Certaines espèces de bacilles à gram+ produisent des  $\beta$ -lactamases chromosomiques, inductibles ou constitutives, qui entraînent la résistance naturelle à de nombreuses  $\beta$ -lactamines. C'est le cas de *Bacillus cereus*, espèce qui cause parfois des infections nosocomiales et qui produit des  $\beta$ -lactamases chromosomiques responsables de sa résistance naturelle à la plupart des  $\beta$ -lactamines (Coleman *et al*, 1994., Charlier *et al*, 1998., Jarlier *et al*, 2000).

En matière de résistance acquise, l'inactivation enzymatique des antibiotiques est le mécanisme le plus fréquent pour ce qui est du nombre d'espèces d'importance médicale et de variété des antibiotiques concernés (Jarlier, 2000). Les  $\beta$ -lactamases plasmidiques qui forment une famille d'enzymes très nombreuses jouent le plus grand rôle en pathologie infectieuse et peuvent être regroupées en quatre catégories :

A- Les pénicillinases au sens strict qui n'inactivent que les pénicillines et qui sont responsables de la résistance acquise aux pénicillines G et A chez *Staphylococcus aureus*.

B- Les  $\beta$ -lactamases à spectre large qui inactivent les pénicillines et en partie les céphalosporines. Ces enzymes sont responsables, par exemple, de la résistance acquise aux pénicillines chez les entérobactéries et *Pseudomonas aeruginosa*. L'exemple type en est TEM-1, identifié chez *Escherichia coli*, qui est l'enzyme la plus souvent impliquée dans la résistance acquise aux pénicillines chez *E. coli* et le gonocoque.

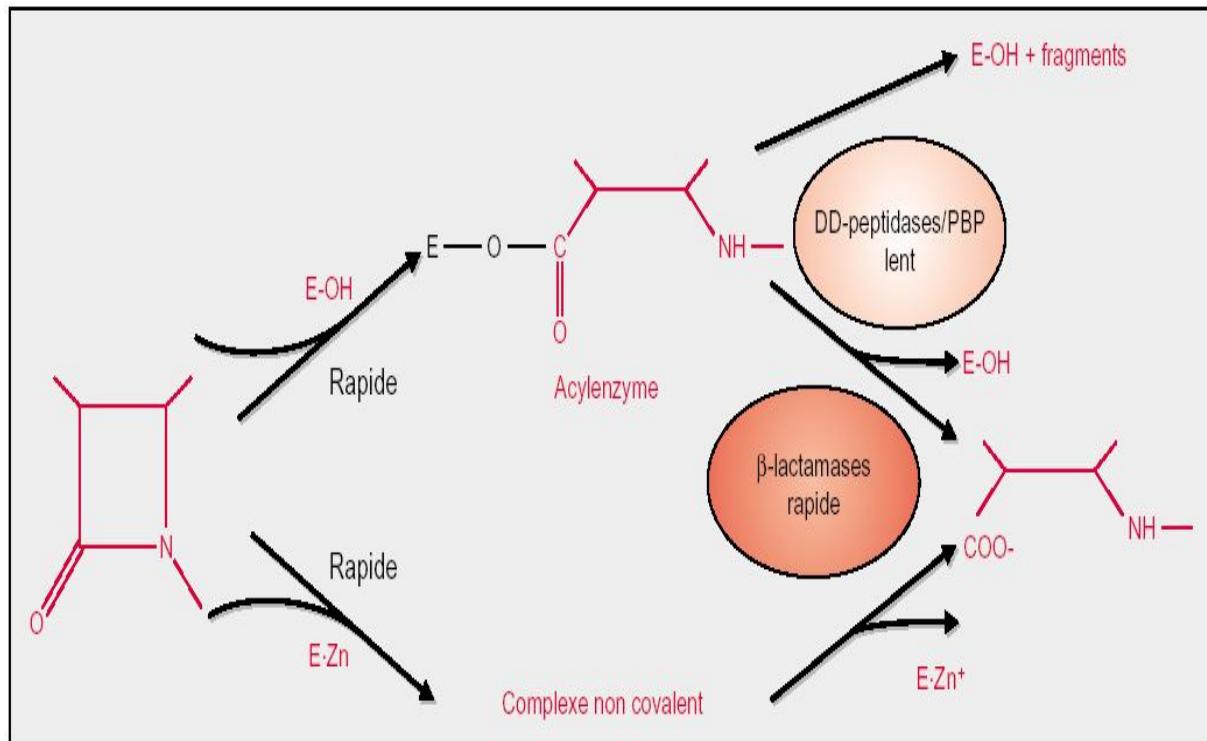
C- Les  $\beta$ -lactamases à spectre étendu, dérivées par mutation ponctuelle des enzymes précédentes et qui inactivent en partie les céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération. Ces enzymes sont produites par des entérobactéries multirésistantes, surtout, *Klebsiella pneumoniae* responsable d'épidémies d'infections nosocomiales.

Ces trois types d'enzymes sont inhibés par les inhibiteurs (acide clavulanique, sulbactam et tazobactam) qui restaurent en grande partie l'activité des pénicillines auxquelles ils sont associés.

D- Les  $\beta$ -lactamases TEM résistantes aux inhibiteurs (TRI), dérivées par mutation ponctuelles des  $\beta$ -lactamases TEM-1 ou TEM-2 et qui sont responsables de la résistance aux pénicillines. Ces enzymes ont été identifiées depuis quelques années chez des souches de *E. coli* résistantes à l'association amoxicilline-acide clavulanique (Henquel *et al*, 1995).

Les  $\beta$ -lactamases hydrolysent le cycle  $\beta$ -lactame (figure 1), inactivant ainsi l'antibiotique. Ces enzymes sont sécrétées dans le milieu extérieur chez les bactéries à Gram<sup>+</sup> et dans l'espace périplasmique chez les bactéries à Gram<sup>-</sup>. Les gènes peuvent être portés par le chromosome ou des plasmides, parfois par des transposons ou des intégrons. La présence des gènes sur ces éléments génétiques transférables facilite évidemment leur dispersion dans le monde bactérien. L'expression des gènes est constitutive ou inductible (Charlier *et al*, 1998).

Plus de deux cents  $\beta$ -lactamases différentes ont été identifiées. Sur la base du mécanisme catalytique, on distingue les enzymes à sérine active réparties, selon leurs structures primaires, dans les classes A, C et D et les enzymes à  $Zn^{+2}$ , qui forment la classe B. Dans certains cas, des inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases comme l'acide clavulanique ou le sulbactam sont associés aux  $\beta$ -lactamines pour restaurer l'activité antibiotique (Bush, 1995).



**Figure N°1 :** Ouverture du noyau  $\beta$ -lactame par les DD-peptidases ( $E-OH$ ) et les  $\beta$ -lactamases ( $E-OH$  ou  $E-Zn$ ) (Charlier *et al*, 1998).

Les souches résistantes aux aminosides et phénicol synthétisent des enzymes qui transfèrent un groupement chimique sur l'antibiotique. Le chloramphénicol est inactivé par acétylation (chloromphénicol-acétyltransférases) des fonctions  $-OH$  présentes sur la chaîne latérale de la molécule. Les aminoglycosides peuvent être inactivés par acétylation d'une fonction  $-NH_2$  (acétyltransférases) ou par adénylation (adényltransférases) ou phosphorylation (phosphotransférases) d'une fonction  $-OH$  de l'antibiotique (Jarlier, 2000).

### I-2-2 Résistance par modification de la cible de l'antibiotique

Par mutation ou acquisition de gènes étrangers selon les cas, la modification entraîne un défaut d'affinité entre l'antibiotique et la cible bactérienne. Les mécanismes de la résistance acquise par modification de l'affinité de la cible à l'antibiotique sont le plus souvent la conséquence de mutations (Jarlier, 2000).

La résistance acquise aux quinolones est à caractère chromosomique. Les enzymes cibles, suites à une mutation, deviennent moins sensibles, voir totalement insensibles à l'action inhibitrice des quinolones. Ces mutations affectent principalement le gène *gyrA*, puis le gène *gyrB* codant pour les sous-unités A et B de l'ADN-gyrase. L'analyse séquentielle de l'ADN bactérien montre que les mutations entraînent une résistance concernant fréquemment les acides aminés proche du site de fixation de la sous-unité GyrA (Tyr122 chez *E. coli*). Cette région est nommée RDRQ. C'est la région déterminante pour la résistance aux quinolones (Yoshida *et al*, 1990., Yoshida *et al*, 1988). Elle s'étend des acides aminés 67 à 107. Les mutations de *gyrB* conférant un haut niveau de résistance sont aussi situées dans une région spécifique : Asp246 et Lys447 du Gène *gyrB* chez *E. coli* (Yamagishi *et al*, 1986). Les mutations peuvent aussi concerner les gènes *parC* et *parE* codant pour les deux sous-unités de la topoisomérase IV (Khodursky *et al*, 1995). Chez *E. coli*, l'ADN-gyrase est la cible principale (Hooper, 2001), si bien que les bactéries résistantes par mutation du gène *parC* ne sont détectables que chez les mutants *gyrA* et à des concentrations élevées en fluoroquinolones (Khodursky *et al*, 1995., Chen *et al*, 1996).

La résistance de *S. aureus* à la méticilline (SARM) par modification de la cible est due à la production d'une nouvelle PLP (protéine liant les pénicillines) appelée PLP2a présentant peu d'affinité pour la méticilline et toutes les autres  $\beta$ -lactamines. La PLP2a est codée par le gène *mecA*, dont l'expression dépend au moins de deux systèmes régulateurs agissant au niveau transcriptionnel : le système de gènes *mecI* et *mecRI* situés en amont du gène *mecA* et le système *blaI* et *blaRI* situés en amont du gène *blaZ* de la pénicillinase. La protéine MecRI, produit du gène *mecRI*, agirait comme transducteur de signal, elle détecte la présence de  $\beta$ -lactamine grâce à son domaine extracellulaire. Une fois l'antibiotique lié, il y a activation du domaine intracellulaire. Celui-ci subirait une activation par protéolyse limitée lui conférant une activité protéasique. Cette dernière conduit à la dégradation du MecI (répresseur de la transcription codé par *mecI*) qui est fixé au niveau de l'opérateur d'où libération de ce dernier et expression du *mecA* (Nour *et al*, 2005).

Chez les entérocoques la résistance acquise aux glycopeptides, est liée à l'acquisition de plusieurs gènes codants pour un nouveau système enzymatique capable d'assurer la synthèse d'un autre monomère pouvant servir de précurseur au peptidoglycane mais ayant une mauvaise affinité pour ces antibiotiques. Cette résistance est plus souvent plasmidique et donc transférable (Jarlier et Nordmann, 2000).

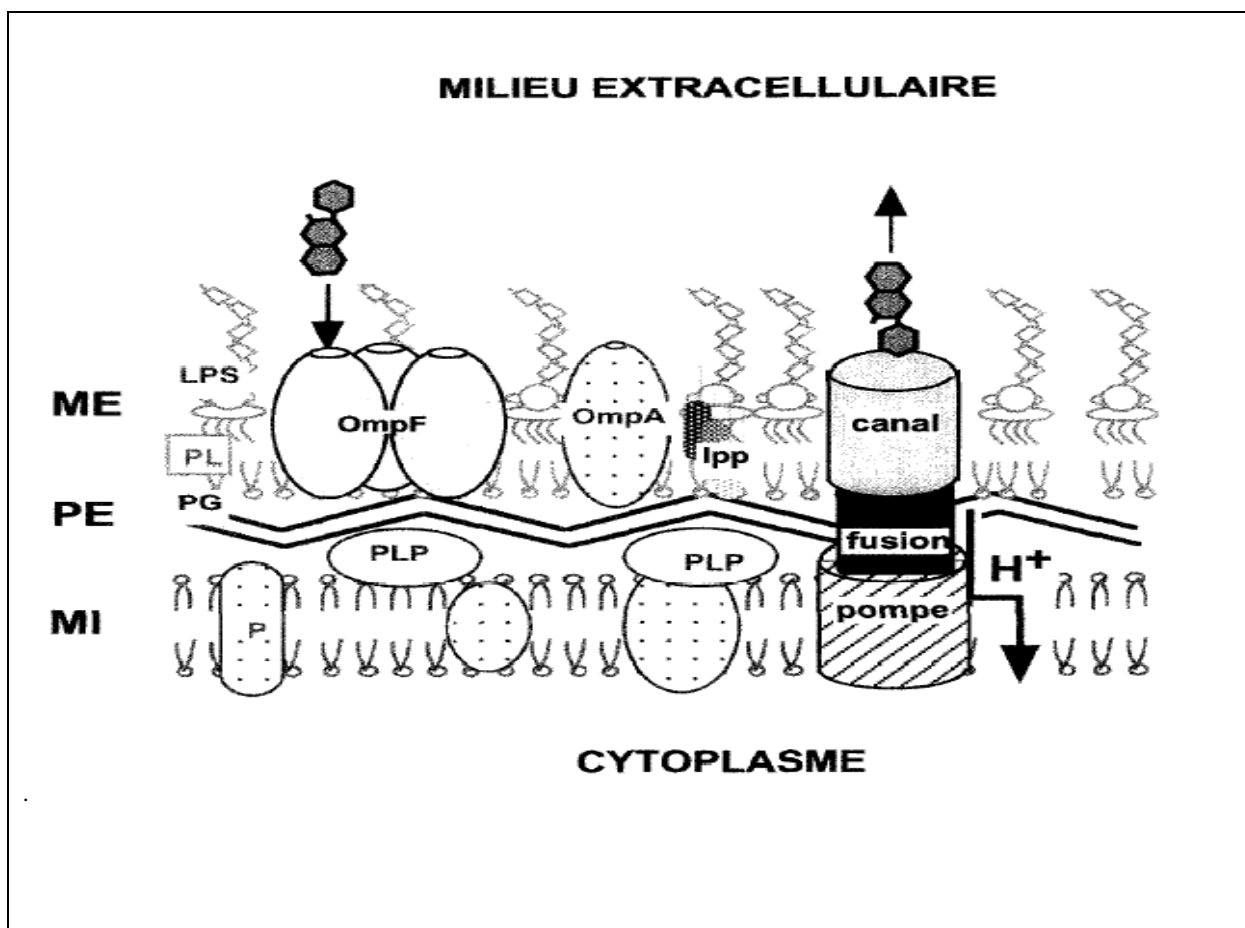
La résistance aux sulfamides est aux triméthoprimes résulte le plus souvent de l'acquisition de gènes plasmidiques, codant pour les enzymes cibles de ces antibiotiques (dihydroptéroate synthase) et qui synthétisent les précurseurs des acides nucléiques. Ces enzymes, qui se surajoutent à celles déjà présentes à l'état naturel dans la bactérie, sont, elles, insensibles à ces antibiotiques. Enfin, le principal mécanisme de résistance acquise des cocci à Gram<sup>+</sup> (staphylocoques et streptocoques) aux macrolides résulte de la modification des ribosomes, cibles de ces antibiotiques, causée par une méthylase codée par un gène étranger qui est en général en situation plasmidique. Cette modification entraîne une diminution de l'affinité pour ces antibiotiques (Jarlier, 2000).

### **I-2-3 Résistance par imperméabilité et efflux actif de l'antibiotique**

Un des facteurs clés intervenant dans l'activité antibactérienne des antibiotiques est la concentration intracellulaire atteinte sur la cible. Chez les bactéries à Gram-, l'enveloppe comprend deux membranes, la membrane externe et la membrane cytoplasmique ou interne (figure 2). Elles constituent à la fois une barrière de protection contre les agents toxiques présents dans le milieu, et une structure complexe qui contient divers mécanismes protéiques assurant le transport d'éléments indispensables à la survie et à la croissance bactérienne.

La membrane externe est formée d'une couche interne de phospholipides et d'une couche externe de lipopolysaccharide comprenant le lipide A (partie hydrophobe) et une partie hydrophile polysaccharidique. Si elle permet le passage des substances lipophiles de taille réduite, la nature hydrophobe de cette membrane externe empêche celui des substances hydrophiles. Des protéines, les porines, forment des canaux dans la membrane externe par lesquelles diffusent, de manière non spécifique, les molécules de faible masse moléculaire (100 à 600) comme les sucres, les acides aminés et les antibiotiques de structure voisine ( $\beta$ -lactamines, aminosides, quinolones...etc.). Ainsi *E. coli* possède deux porines non spécifiques (OmpF et OmpC) et plusieurs porines spécifiques généralement présentes dans certaines conditions physiologiques (PhoE pour les ions phosphates, LamB pour le maltose et

la maltodextrine). *Pseudomonas aeruginosa* a des porines qui remplissent les mêmes fonctions ainsi qu'une porine OprD2 spécifiques des acides aminés basiques (lysine et arginine). De manière générale, ces protéines forment des pores d'un diamètre de 1 à 1,4nm (Charlier *et al*, 1998., Pages et Garnolel, 2003). L'activité des diverses familles d'antibiotiques est fortement dépendante de ces mécanismes de transport membranaire, puisqu'ils interviennent en modulant la concentration intracellulaire de la molécule antibactérienne. Ainsi, L'imipénème franchit la membrane externe de *P. aeruginosa* via la porine OprD2, un phénomène reposant sur l'analogie de structure entre les acides aminés basiques et la chaîne latérale de l'imipénème (Pages et Garnolel, 2003).



**Figure N°2** : Enveloppe d'une bactérie à Gram-, *Escherichia coli* (Pages, 2003).

**MI** : membrane interne ; **PE** : espace périsplasmique ; **Me** : membrane externe ; **LPP** : lipoprotéine ; **LPS** : lipopolysaccharide ; **PL** : phospholipide ; **PG** : peptidoglycane ; **PLP** : protéines de liaison aux pénicillines ; **OmpA** : protéine OmpA ; **OmpF** : porine OmpF.

La membrane externe ne constitue pas à elle seule l'élément déterminant de résistance aux  $\beta$ -lactamines. En général, le temps d'accumulation d'une concentration létale en antibiotique reste inférieur au temps de génération des bactéries. Toutefois, si la bactérie produit une  $\beta$ -lactamase, la membrane externe contribue de deux manières à la résistance bactérienne, en ralentissant la diffusion des  $\beta$ -lactamines et en concentrant les  $\beta$ -lactamases dans l'espace périplasmique (Charlier *et al*, 1998).

L'implication de la membrane externe dans la résistance a été observée chez *E. coli*. La présence d'antibiotique dans le milieu extérieur permet la sélection des souches dans lesquelles la production des porines est affectée, ce qui entraîne une diminution de perméabilité de la membrane externe. Des phénomènes de résistance sont observés pour les antibiotiques empruntant les voies de passage spécifique. Par exemple, la répression de la synthèse de OprD2 ne permet plus la diffusion de l'imipénème dans le périplasme de *P. aeruginosa*. De cette façon, cette bactérie devient résistante à l'imipénème sans que sa viabilité soit significativement affectée (Nikaido, 1989., Trias *et al*, 1990).

Le premier exemple identifié de résistance acquise par efflux actif est celui de la résistance aux cyclines, liée aux protéines "Tet" qui exportent ces antibiotiques en utilisant une force générée par les protons. Ces protéines ont une certaine homologie avec des protéines d'efflux fonctionnant chez les eucaryotes, y compris les mammifères. De nombreux systèmes similaires ont été identifiés chez les bactéries et reconnus responsables de la résistance à des antibiotiques variés comme les fluoroquinolones (pompe NorA de *S. aureus*, les pompes Mex de *P. aeruginosa*). Une caractéristique très importante des systèmes d'efflux actifs est que ceux-ci peuvent parfois entraîner la résistance simultanée à des antibiotiques non reliés structurellement et constituer par là de véritables «systèmes de multirésistance». C'est le cas par exemple du système codé par le groupe de gènes *marRAB* qui est présent à l'état naturel chez *E.coli* mais qui, après mutation, entraîne la résistance aux quinolones, au chloramphénicol, aux cyclines et aux  $\beta$ -lactamines (Trias *et al*, 1989., Murakami *et al*, 2002).

L'inactivation enzymatique et la modification de la cible bactérienne sont des mécanismes retrouvés chez les bactéries à Gram+ et à Gram-. En revanche, l'imperméabilité est un mode de résistance qui n'appartient qu'aux bactéries à Gram-. Le phénomène d'efflux actif a été décrit chez des bactéries à Gram+, telles que les staphylocoques par l'intermédiaire d'un système d'efflux ATP-dépendant qui pompe les macrolides et les fluoroquinolones hors de la cellule bactérienne. Plusieurs de ces mécanismes peuvent coexister chez la même bactérie telle que *P. aeruginosa*, entraînant des multirésistances complexes et parfois difficiles à analyser (Jarlier, 2000., Murakami *et al*, 2002).

En dehors des mécanismes de multirésistance par efflux, la multirésistance aux antibiotiques résulte en général de l'association de différents mécanismes de résistance indépendants. *P. aeruginosa* est l'exemple type de bactérie naturellement multirésistante aux antibiotiques ;  $\beta$ -lactamines habituellement actives sur les entérobactéries, y compris certaines céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération, chloramphénicol et cyclines. La multirésistance de cette espèce saprophyte est liée en grande partie à la très faible perméabilité de sa paroi qui est au moins 100 fois plus faible que celle de *Escherichia coli* et qui est la conséquence de propriétés très particulières (faible nombre, spécificité de substrat) des porines de *P. aeruginosa* (Charlier *et al*, 1998., Murakami *et al*, 2002).

Plusieurs mécanismes acquis de résistance peuvent être simultanément présents dans une même souche bactérienne. C'est en particulier le cas lorsque plusieurs gènes déterminant différents mécanismes de résistance sont portés par le même plasmide, par exemple codant pour des  $\beta$ -lactamases et des enzymes inactivant les aminosides. Cette tendance à l'accumulation des mécanismes acquis de résistance est le résultat des pressions de sélection successivement exercées par les antibiotiques sur les flores bactériennes au fur et à mesure de leur introduction dans les hôpitaux. Un autre exemple de multirésistance acquise est donné par les souches hospitalières de *S. aureus* qui déjà résistantes à la méticilline puis aux aminosides, ont accumulé durant ces dernières années des mécanismes de résistance à de nombreux autres antibiotiques ; fluoroquinolones, rifampicine acide fusidique et fosfomycine (Charlier *et al*, 1998., Jarlier, 2000., Murakami *et al*, 2002).



*Les substances bioactives de  
Fumaria*

## II- Substances bioactives de *Fumaria*

Depuis les temps reculés, l'homme a utilisé des plantes, d'abord pour se nourrir, puis pour se soigner. Il a appris, petit à petit, à reconnaître les plantes comestibles et les plantes toxiques utilisant certaines d'entre elles à des fins thérapeutiques, criminelles, magiques ou pour faciliter la pêche et la chasse. Ces connaissances, d'abord transmises oralement, l'ont été ensuite dans des écrits, ce qui nous a permis de retrouver des traces de l'utilisation des plantes dans les plus anciennes civilisations des différentes parties du monde. Les plantes médicinales ont été utilisées pour prévenir ou soigner diverses maladies et les médicaments actuels ont, pour la majorité d'entre eux, une origine naturelle (Leclercq, 2001).

La fumeterre est une plante dicotylédone de la famille des Fumariacées, qui fleurit depuis le mois d'avril jusqu'au milieu de l'été et pousse dans les champs, les terrains vagues, les décombres et sur les bords des chemins. Son nom, qui signifie fumée de terre, vient du suc de la plante qui fait pleurer les yeux, comme la fumée. On peut aussi penser que ses feuilles grisâtres donnent l'impression d'une sorte de fumée sortant de terre. Ce nom est attesté au début du XIII<sup>ème</sup> siècle sous la forme *fumus terrae* (Stahl *et al*, 1975., Debelmas *et al*, 1978).

Les différentes espèces forment rapidement leurs feuilles, leurs fleurs ainsi que leurs fruits au printemps. Elles disparaissent ensuite, ne laissant aucune trace à la surface du sol en été. Seules les parties souterraines subsistent d'une année à l'autre. Ces plantes sont réparties dans l'ensemble des régions tempérées de l'hémisphère nord et plus particulièrement dans toutes les régions tempérées d'Europe. Vingt deux espèces du genre *Fumaria* sont spécifiques à la région Ibero-Mauritanienne qui inclut l'Algérie, le Maroc et l'Espagne (Liden, 1986., Blanco *et al*, 1993).

Les propriétés médicinales de ces plantes sont connues depuis l'antiquité, en effet la fumeterre apparaît dans les écrits de Dioscoride et Galien (I<sup>er</sup> et II<sup>ème</sup> siècle) qui notaient déjà son activité sur la sécrétion biliaire et les fonctions hépatiques. Largement étudiée par les médecins arabes au X<sup>ème</sup> siècle, la fumeterre est décrite dans la pharmacopée du Moyen-Âge et dans le traité du naturaliste Italien Matthiolo (1558), comme dépuratif du foie, de la vésicule biliaire et du sang (Trease et Evans, 1978., Pinkas *et al*, 1990).

## II-1 Classification botanique des Fumariacées (Preininger, 1986)

**Règne :** Plantae

**Sous règne :** Métaphytes

**Embranchement :** Cormophytes

**Classe :** Dicotylédones

**Sous-classe :** Magnoliopsida

**Ordre :** Papavérales

**Famille :** *Fumariaceae*

Les Fumariacées peuvent être divisées en deux sous-familles (Liden *et al*, 1997).

### II-1-1 Les hypecoidées

*Hypocoum* et *pteridophyllum* forment la première sous-famille, possédant des fleurs à 4 étamines seulement.

### II-1-2- Les Fumarioidées

Les autres genres sont classés parmi les Fumarioidées, leurs fleurs possèdent 6 étamines. Dans cette sous-famille on peut trouver les genres suivants (Lopez, 1991., Morales *et al*, 1991).

- **Le genre *Dicentra*** : plantes dressées ; fleurs blanches, en grappe.
- **Le genre *Adlumia*** : plantes grimpantes ; fleurs purpurines.
- **Le genre *Corydalis*** : Les fleurs ont de 10 à 12mm de longueur, le fruit est une capsule siliquiforme ; comprend 300 espèces.
- **Le genre *Fumaria*** : les fleurs ont de 4 à 6mm de longueur, le fruit est globuleux, à une seule graine ; il existe 50 espèces différentes, les plus répandues en Algérie sont : *F. officinalis*, *F. macnospala*, *F. macnospala*, *F. capreolata*, *F. parviflora*, *F. bastardii*, *F. agaria*, *F. flabellata*, *F. spicalus*, *F. densiflora*, *F. vaillantii* (Quezel et santa, 1963)

## II-2 Les alcaloïdes

Depuis toujours, les plantes médicinales ont été utilisées pour prévenir ou soigner diverses maladies et les médicaments actuels ont, pour la majorité d'entre eux, une origine naturelle. La recherche sur les substances naturelles est un thème porteur depuis quelques années et les laboratoires pharmaceutiques, toujours à la recherche de nouveaux composés actifs, se tournent de plus en plus vers l'identification et la caractérisation de molécules issues de matrices naturelles, et s'inspirent de leur structure moléculaire pour imaginer de nouveaux médicaments (Verpoorte, 2000).

Les métabolites secondaires sont souvent considérés comme n'étant pas essentiels à la vie de la plante. Ils sont biosynthétisés à partir des métabolites primaires et jouent un rôle majeur dans les interactions de la plante et son environnement, contribuant ainsi à la survie de l'organisme dans son écosystème. Plus de 85000 métabolites secondaires sont déjà connus. Les plus grands groupes sont les polyphénols et les alcaloïdes. Ils présentent une énorme valeur économique (en particulier pour l'industrie pharmaceutique et/ ou cosmétique...etc.). Ces composés sont utilisés en tant que drogues, arômes, parfums, insecticides, ou colorants. Malgré le développement de la synthèse chimique, les plantes sont encore une source importante des substances médicinales. En médecine occidentale, environ 20% des médicaments utilisés sont extraits à partir des plantes. Parallèlement au développement des utilisations des métabolites secondaires à usage thérapeutique, le domaine de la cosmétique est aussi très demandeur de substances végétales (Gontier *et al*, 1999., Raven, 2000).

Dans notre travail on s'est intéressé à l'étude de l'activité antibactérienne des alcaloïdes. Si la notion d'alcaloïdes est assez récente, la connaissance de la toxicité des plantes et des drogues à alcaloïdes est très ancienne, opium, coca, belladone, aussi bien que quinquina ipéca ou curares sont employés depuis plusieurs siècles, voire pour certains depuis plusieurs millénaires. Le terme alcaloïde a été introduit par W. Meisner au début du XIX<sup>ème</sup> siècle pour désigner des substances naturelles réagissant comme des bases, comme des alcalis (de l'arabe *al kaly*, la soude et du grec *eidōs*, l'aspect). La morphine a été le premier alcaloïde isolé dans l'opium (vers 1805), puis la strychnine (1818), la caféine (1918)...etc. Les autres alcaloïdes les plus connus sont : le curare, la colchicine, la théine et la cocaïne (Richter, 1993., Bruneton, 1999).

Un alcaloïde est un composé organique d'origine naturelle (le plus souvent végétale), azoté, plus ou moins basique, de distribution restreinte et doué, à faible dose, de propriétés pharmacologiques marquées. A l'état naturel, les alcaloïdes existent le plus souvent sous forme de sels d'acides minéraux ou organiques et parfois des combinaisons (avec les tanins en particulier). Ces éléments caractérisent les alcaloïdes vrais, les pseudo-alcaloïdes présentent le plus souvent toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais, mais ne sont pas des dérivés des acides aminés. Il s'agit dans la majorité des cas connus d'isoprénoides (alcaloïdes terpéniques), alors que les proto-alcaloïdes sont des amines simples dont l'azote n'est pas inclus dans un système hétérocyclique ; ils ont une réaction basique et sont élaborés *in vivo* à partir d'acides aminés (Bruneton, 1999).

### **II-2-1 Distribution et localisation des alcaloïdes**

Les alcaloïdes sont exceptionnels chez les bactéries (pyocyanine de *pseudomonas aeruginosa*) et assez rares chez les champignons (psilocine des champignons hallucinogènes de l'Amérique centrale, ergolines des *Claviceps*...etc.). Les structures alcaloïdiques existent également chez les animaux. Dans certains cas ce sont des produits formés à partir des alcaloïdes contenus dans les végétaux inclus dans la ration alimentaire de l'animal, c'est le cas de la castoramine issue de la métabolisation des alcaloïdes des nénuphars que consomme le castor et des alcaloïdes pyrrolizidiniques présent chez certains papillons. Chez les végétaux, les alcaloïdes sont des composés essentiellement présents chez les Angiospermes. Ils sont extraits de plantes qui appartiennent principalement à quatre familles botaniques ; les Papavéracées, les Fumariacées, les Renonculacées et les Solanacées (Richter,1993., Bruneton,1999).

## II-2-2 Classification des alcaloïdes

Les alcaloïdes ne constituent pas une catégorie définie de composés chimiques en raison de la variété de leurs structures moléculaires. Certains scientifiques classent les alcaloïdes selon leurs propriétés pharmacologiques ou encore selon leur distribution botanique. La classification fondée sur le squelette de base de l'hétérocycle azoté constitutif de la molécule (alcaloïdes tropaniques, quinoléiques, isoquinoléiques, indoliques,...etc.) est également possible (figure 3). Une autre façon de classer ces composés, est de prendre en considération en plus de la structure, l'origine biosynthétique du composé (Shakil, 1998).

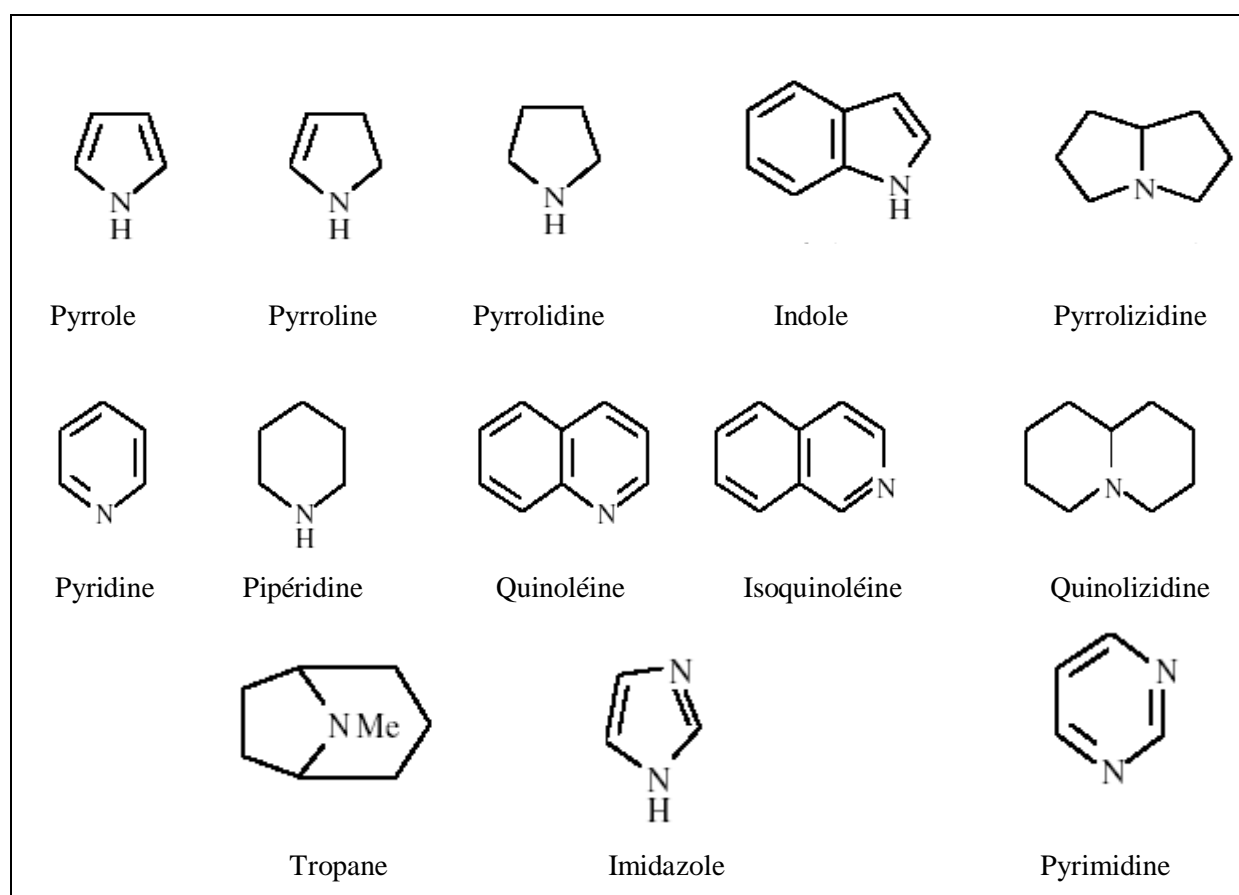


Figure N°3 : Structure des hétérocycles constituant le noyau de base des alcaloïdes (Shakil,1998).

### **II-2-3 Biosynthèse des alcaloïdes**

La biosynthèse des alcaloïdes a lieu au niveau du réticulum endoplasmique, la basicité et les actions antimétabolites de la plupart de ces alcaloïdes imposent leur compartimentation dans les vacuoles cellulaires. Le plus souvent la synthèse de ces alcaloïdes s'effectue au niveau de sites précis (racine en croissance, chloroplastes), ils sont ensuite transportés dans leur sites de stockage (Bruneton, 1999., Raven, 2000).

Les grandes lignes de la biosynthèse des alcaloïdes sont connues, notamment grâce à l'emploi d'éléments marqués et de techniques de dégradation spécifique. Certaines réactions intermédiaires restent toutefois hypothétiques, de même que certains mécanismes biogénétiques. L'ornithine et la lysine, acides aminés diamines, la phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane, acides aminés aromatiques, sont le point de départ de la synthèse de nombreux alcaloïdes. Dans tous les cas la première étape est la décarboxylation des acides aminés par des décarboxylases spécifiques. La figure 4 rassemble les principaux systèmes hétérocycliques de base et les relie à leurs précurseurs (Bruneton, 1999).

La biosynthèse de l'alcaloïde peut nécessiter l'intervention d'une seule molécule d'acide aminé (hygrine, cathine), de deux molécules du même acide aminé (quinolizidines, benzyloquinoléines), plus rarement de deux acides aminés différents (tubulosine) ou de plusieurs molécules du même (spartéine). La tyrosine et la phénylalanine, composés à l'origine du noyau aromatique sont les précurseurs de l'important groupe des alcaloïdes isoquinoléiques (Richter, 1993., Bruneton, 1999).

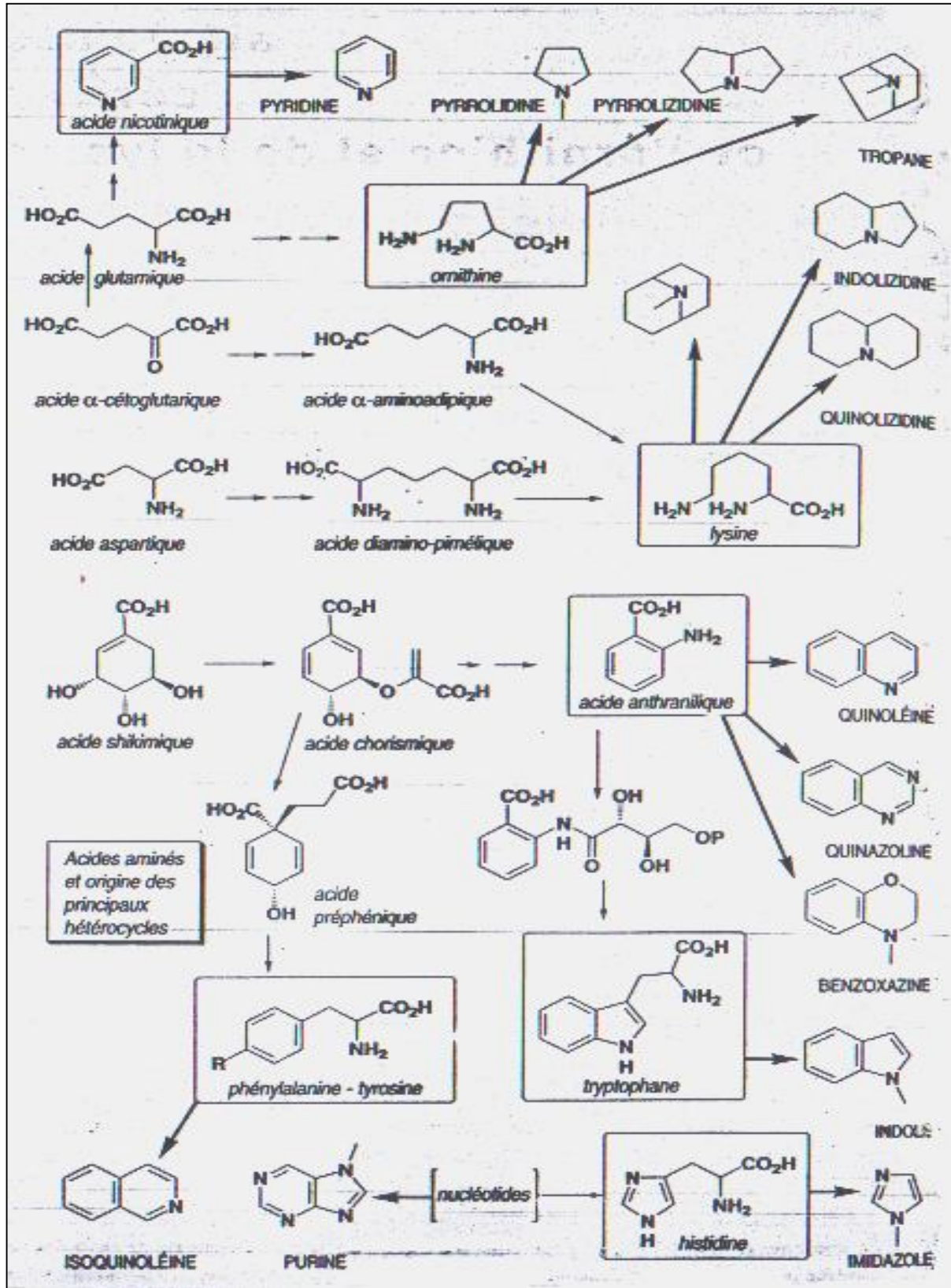


Figure N°4 : Biosynthèse ds alcaloïdes (Bruneton, 1999).



### II-2-3-1 Biosynthèse des alcaloïdes isoquinoléiques

La première étape de la biosynthèse de toutes les classes des alcaloïdes isoquinoléiques est la même, aboutissant à la formation de la norcoclaurine (figure 5), qui occupe une position- clé, plus de 70 alcaloïdes en dérivent (Richter, 1993). En effet, la formation de cet intermédiaire débute par la condensation de deux dérivés de tyrosine, la dopamine et le 4-hydroxyphénylacétaldéhyde, réagissant ensemble pour former la norcoclaurine (Richter, 1993). D'après (Marek *et al*, 1999), on peut classer les alcaloïdes isoquinoléiques en 11 principaux groupes (Tableau II).

**Tableau N°II** : Les principaux groupes d'alcaloïdes isoquinoléiques (Marek *et al*, 1999).

Type	Alcaloïdes
Indenobenzazepine	Fumarifine.
Spirobenzylisoquinoline	Fumaritine, Densiflorine, Fumariline, Fumaricine, Dihydrofumariline.
Protoberberine	Stylophine, Coptisine.
Phtalideisoquinoline	Adlumidine.
Aporphine	Isoboldine, Domesticine.
Protopine	Protopine, Cryptonine.
Benzophenanthridine	Dihydrosanguinarine, Sanguinarine.
Papavérine	Papavérine, laudanine.
Morphine	Morphine, codéine, thébaine.
Tetrahydroprotoberberine	Stylophine, Phtalideisoquinoline.
Isoquinoline	Noroxyhydrastinine, Oxyhydrastinine.

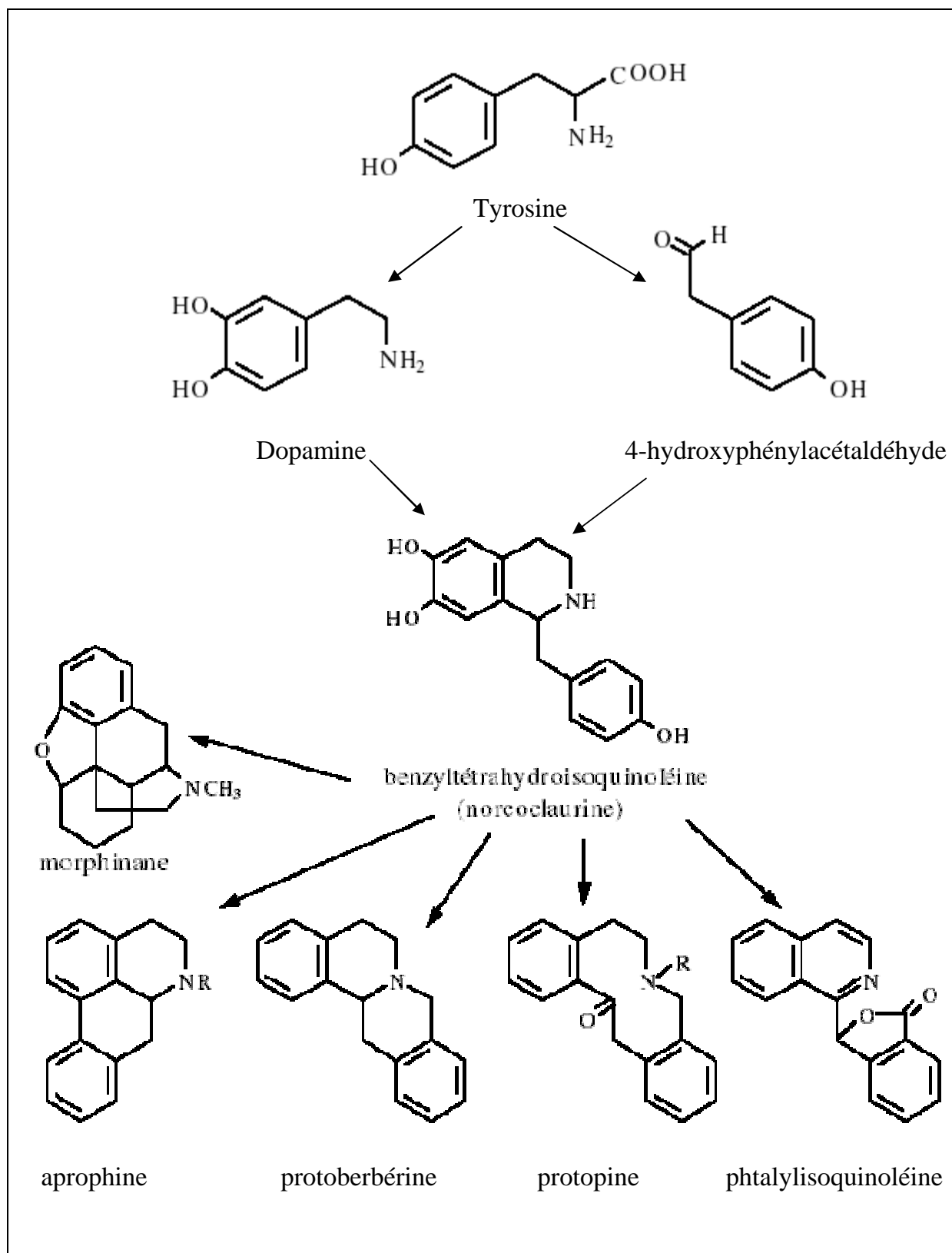


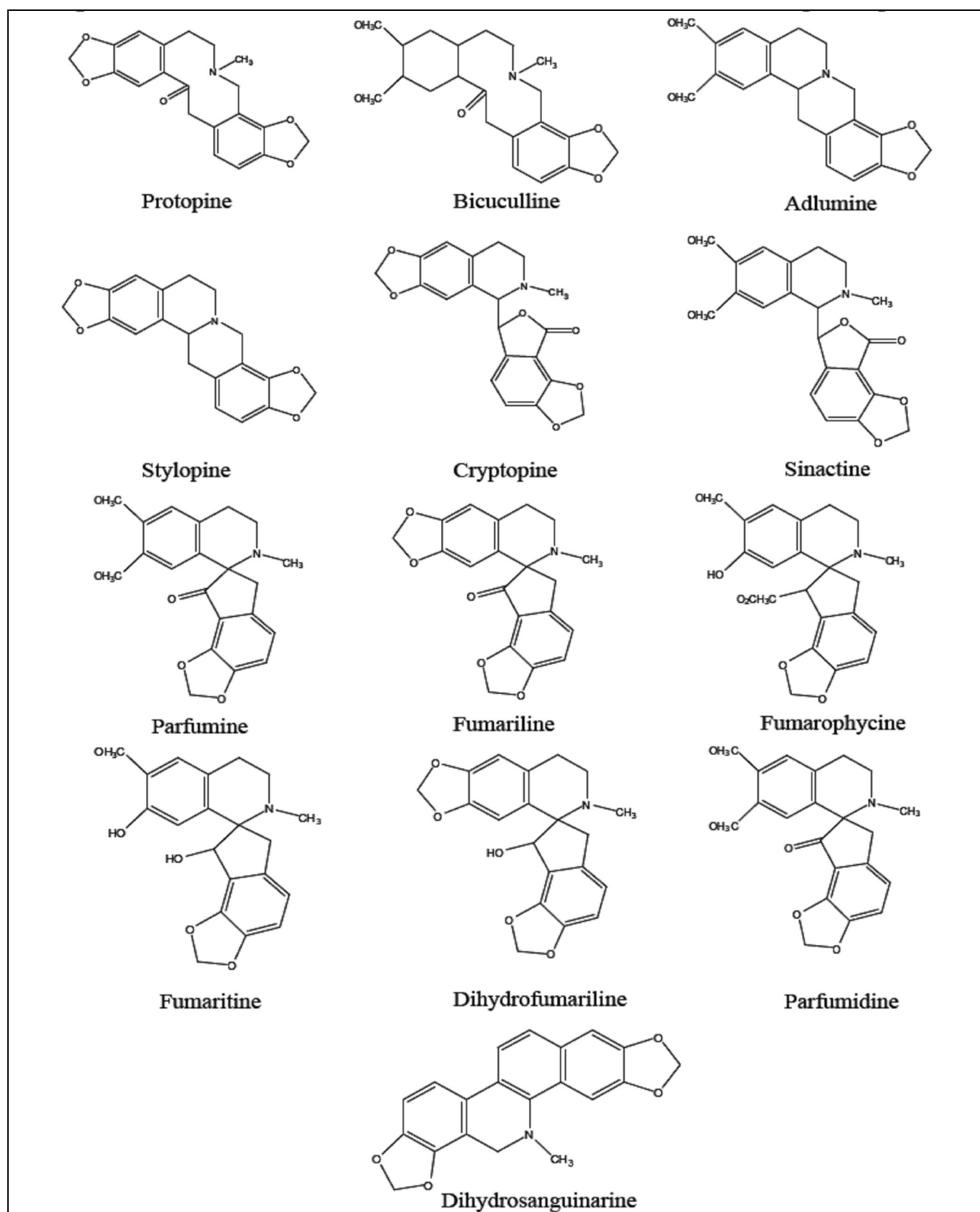
Figure N°5 : Biogenèse des principaux alcaloïdes isoquinoléiques (Bruneton, 1999).

**II-2-4 Les alcaloïdes de *Fumaria***

Les fumariacées sont des plantes alcaloïdiques, connues pour leur richesse en alcaloïdes isoquinoléiques et leurs multiples activités biologiques. Le tableau III résume la composition en alcaloïdes isoquinoléiques de certaines espèces de *Fumaria* sp. Sur la figure 6 sont reportées les structures chimiques des composés les plus importants (Shakil, 1998).

**Tableau N°III:** Les alcaloïdes de certaines espèces de *Fumaria* (Marek *et al*, 1999., Suau *et al*, 2002).

Espèces	Alcaloïdes
<i>F. agaria</i>	Adlumiceine, Coptisine, Cryptopine, Fumariline, Fumaritine, Fumarophycine, Parfumine, <i>N</i> -methylstylopine.
<i>F. capreolata</i>	Adlumiceine, Coptisine, Cryptopine, Fumariline, Protopine, Fumaritine, Fumarophycine, Parfumine, <i>N</i> -methylstylopine.
<i>F. muralis</i>	Coptisine, Cryptopine, Fumariline, Fumaritine, Fumarophycine, Parfumine, <i>N</i> -methylstylopin, <i>O</i> -methylfumarophycine, Sinactine, Stylopine.
<i>F. officinalis</i>	Adlumiceine, Coptisine, Corytuberine, Parfumine, <i>N</i> -methylstylopine.
<i>F. parviflora</i>	Coptisine, Cryptopine, Fumaritine, <i>N</i> -methylstylopin, Sinactine.
<i>F. spicata</i>	Adlumiceine, Coptisine, Fumariline, Fumarophycine, <i>N</i> -methylstylopin, Sinactine, Protopine.
<i>F. vaillantii</i>	Fumaricine, Fumarophycine, <i>O</i> -methylfumarophycine.
<i>F. bastardii</i>	Fumariline, Fumaritine, <i>O</i> -methylfumarophycine, Protopine, Stylopine, Tetrahydropalmitine,



**Figure N°6** : Structure chimique de quelques alcaloïdes isoquinoléiques présents chez le genre *Fumaria* (Suau *et al.*, 2002).

## II-2-5 Action pharmacologique des alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances particulièrement intéressantes pour leurs activités pharmacologiques qui s'exercent dans les domaines les plus variés. Ils sont utilisés dans le traitement des maladies cardiovasculaires, nerveuses, gastrointestinales de l'homme et des animaux (Khalid *et al*, 2004., Milne *et al*, 2004). De nombreux alcaloïdes ont une action sur le système nerveux, fréquemment sur le système nerveux central, qu'il soit dépresseurs (morphine, scopolamine) ou stimulants (strychnine, caféine), parfois sur le bulbe (colchicine) et la moelle (strychnine). Plusieurs sont hallucinogènes (psilocine), d'autres agissent sur les extrémités des nerfs moteurs au niveau des plaques motrices des muscles (curarine) (Khalid *et al*, 2004).

On notera aussi l'existence d'anesthésiques locaux (cocaïne), d'antifibrillant (quinine), d'antipaludique (quinine), d'amoebicides (émétine). La berbérine est douée de propriétés bactériostatiques à faible dose, bactéricides à dose plus forte. *In vitro*, elle est active sur de nombreux germes (staphylocoques, streptocoques, mais aussi salmonelles, proteus, vibrions...etc.). Elle est également fongicide et toxique à l'égard de divers protozoaires (leishmanies, *plasmodium*). Elle diminue le péristaltisme intestinal (Bruneton, 1999., Khalid *et al*, 2004).

Les protoberbérines sont des alcaloïdes tétracycliques quaternaires ou tertiaires (tétrahydroprotoberbérines). Leurs voies de biosynthèse sont importantes, en particulier *via* les protopines, issues de la rupture de la liaison entre le C-14 et l'azote. Parmi les nombreux dérivés issus de l'oxydation et du réarrangement des tétrahydroprotoberbérines, certains présentent des propriétés pharmacologiques intéressantes. C'est le cas des phtalyltétrahydroisoquinoléines : activité antagoniste de l'acide gamma-aminobutyrique de la bicuculline. C'est aussi celui des benzophénanthridines quaternaires : Propriétés antitumorales de la nitidine et de la fagaronine, inhibition de la transcriptase-inverse virale par ces mêmes molécules par liaison sur des paires de bases spécifiques. La pharmacologie de la protopine est mieux connue ; spasmolytique, anticholinergique, antiarythmique et antibactérienne, elle augmente la fixation de l'acide gamma-aminobutyrique sur ses récepteurs centraux. Ces différentes activités (et autres) conduisent à une utilisation importante des drogues à alcaloïdes (Bruneton, 1999).

---

*Chapitre II*  
*Matériel et méthodes*

## I-Matériel

### I-1 Le matériel végétal

Sur la base de leur utilisation en médecine traditionnelle, notre étude a été réalisée sur la partie aérienne (fleurs, feuilles et tiges) de deux espèces de *Fumaria* :

- La partie aérienne de la plante *Fumaria bastardii* (Fb).
- La partie aérienne de la plante *Fumaria capreolata* (Fc).

Le matériel végétal sain (exempt de toute attaque fongique ou d'insecte) a été récolté de deux stations : Amizour et Targa-Ouzemmour (Dans la wilaya de Bejaia), durant la période de fructification et de floraison (Avril, 2008), moment propice pour la cueillette, loin de la pollution et ceci pour écarter toute modification dans la composition chimique des deux espèces. Leur identification est effectuée, au laboratoire de biologie végétale, de la FSNV, de l'Université A. Mira de Bejaia, et en utilisant la flore des plantes Algériennes (Quezel et Santa, 1963).

#### I-1-1 Description botanique de *Fumaria capreolata* (Fumeterre grimpante)

Les caractéristiques d'identification de *Fumaria capreolata* sont reportées sur le tableau IV. C'est une plante herbacée annuelle ou bisannuelle, hermaphrodite de 20cm à 1m de longueur (Figure 7).

**Tableau N° IV** : Caractéristiques morphologiques de *F. capreolata* (Salinas *et al*, 2003).

Organe	Caractéristique
Tige	Rameuse, grimpante grâce aux pétioles contournés en vrilles.
Les feuilles	Vert clair, alternes, pétiolées, composées.
Les fleurs	Blanches à roses et pourpre au bout.
Inflorescence	Racème simple, assez lâche, pédicelle arqué-récurvé.
Floraison	Avril-Juin.
Le fruit	Capsule lisse, sphérique, à une graine, avec un creux au sommet.
Habitat	Bord des chemins, haies, talus, murs.



**Figure N°7** : Photographie de *Fumaria capreolata* (Targa-Ouzemmour, 2008)

### I-1-2 Description botanique de *Fumaria bastardi*

Les caractéristiques d'identification de *Fumaria bastardi* sont reportées sur le tableau V. C'est une Plante annuelle ou bisannuelle de 10 à 70cm de longueur (Figure 8).

**Tableau N°V** : Caractéristiques morphologiques de *F. bastardi* (Liden, 1986).

Organe	Caractéristique
Les feuilles	Alternes de couleur verte, à segments étroits et aplatis.
Les fleurs	Zygomorphes, de couleur rose pourprée à sommet noir.
Inflorescence	Racème simple, assez lâche, pédicelle arqué-récurvé.
Floraison	Mars – juin.
Le fruit	Formé d'une capsule à une graine, pointu au sommet.
Habitat	Extrêmement rare, on la retrouve généralement dans les champs, et au bord des murs.





**Figure N°8** : Photographie de *Fumaria bastardi* (Amizour, 2008).

## **I-2 Matériel et réactifs**

Le matériel et réactifs utilisés pour les différentes extractions et pour tester l'activité antibactérienne sont reportés en annexe (annexe N°1).

## II- Méthodes

### II-1 Séchage

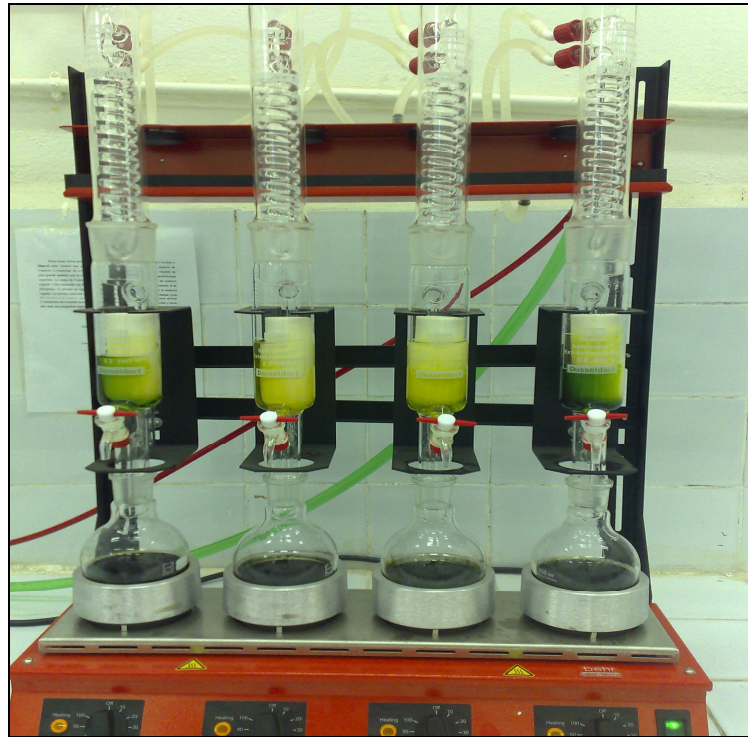
Les échantillons de *Fumaria* sont lavés et débarrassés de la poussière, du sable et autres particules (à l'eau courante), découpés en petits morceaux, puis séchés à l'étuve à 40°C pendant dix jours, Pour obtenir une meilleure extraction, le séchage complet est confirmé par le test d'humidité. Le séchage à l'étuve permet d'uniformiser le taux d'humidité résiduelle des échantillons et permet un meilleur broyage (Debuigne, 1991).

### II-2 Broyage et tamisage

Les échantillons séchés sont réduits en poudre grâce à un broyeur électrique « KIKA Labortechnik ». Le tamisage a été réalisé avec un tamiseur à huit tamis de marque «RETSCH», dont les diamètres sont : 4mm, 2mm, 1mm, 500µm, 250µm, 125µm, 63µm et 45µm. Les poudres obtenues sont conservées dans des récipients en verre scellés et stockés à l'abri de la lumière. Seule la poudre dont le diamètre est inférieur à 45µm a servi pour la préparation des échantillons des deux espèces de *Fumaria*. La procédure d'extraction des composés actifs des plantes est influencée par la granulométrie (la taille des particules de l'échantillon). La meilleure extraction est obtenue avec le plus petit calibre (45µm), ceci est peut être du à l'augmentation de la surface de contact avec le solvant (Naczki et Shahidi, 2004).

### II-3 Extraction des alcaloïdes

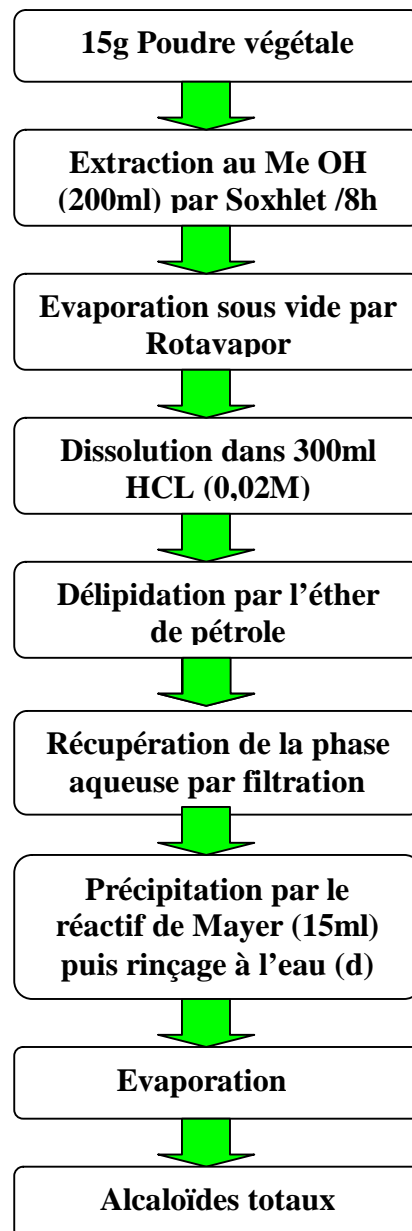
Dans cette partie du travail on s'est intéressé à l'extraction des alcaloïdes. Nous avons utilisé la méthode d'extraction par « Soxhlet » (figure 9) pour extraire une quantité plus importante de poudre sèche de nos espèces de *Fumaria*.



**Figure N°9 :** Montage d'extraction (Soxhlet).

L'extracteur de « Soxhlet » permet le traitement de solides (matériel végétal) en plus grande quantité que la macération, avec des solvants en phase liquide ou partiellement. Le corps de l'extracteur, contenant une cartouche remplie de l'échantillon à analyser, est fixé à la partie supérieure et est surmonté d'un réfrigérant. Le solvant est vaporisé puis condensé tout en restant en contact avec le matériel végétal pour donner une solution qui est soutirée périodiquement par l'amorçage d'un siphon. La solution collectée dans le ballon s'enrichit de plus en plus en soluté à chaque cycle d'extraction et le matériel végétal est toujours en contact avec du soluté fraîchement distillé. L'extraction est terminée lorsque le solvant d'extraction devient de plus en plus clair, c'est-à-dire, sans une proportion significative de soluté d'alcaloïdes (Houghton et Raman, 1998).

Pour l'extraction des alcaloïdes à partir des différents complexes chimiques présents dans le végétal, plusieurs solvants peuvent être utilisés ; hexane, chloroforme, éthyle éther, acétone, acétate d'éthyle, éthanol, méthanol ou eau. En ce qui nous concerne, nous avons opté pour le méthanol comme solvant de départ, car les solvants alcooliques (éthanol, méthanol) donnent de meilleurs taux d'extraction. La méthode d'extraction utilisée est solide-liquide, selon le protocole préconisé par Souseck *et al* (1999). Le protocole d'extraction des alcaloïdes totaux est schématisé sur la figure 10.



**Figure N°10** : Protocole d'extraction des alcaloïdes totaux des parties aériennes de *Fumaria bastardi* et *Fumaria capreolata* (Souseck *et al*, 1999).

#### II-4 Test phytochimique

La nature alcaloïdique de nos extraits est confirmée par le test phytochimique spécifique selon la méthode de Paule (1963). Cinq millilitres d'extrait sont évaporés à l'air. Le résidu est repris par 5ml de diméthylsulfoxyde (DMSO) dans un tube à essai et on ajoute quelques gouttes du réactif de Dragendorff. L'apparition d'un précipité orangé indique la présence d'alcaloïdes dans la solution.

#### II-5 Préparation de la gamme de concentration des alcaloïdes

Avant la préparation de la gamme de concentration, les alcaloïdes sous forme de poudre ont été stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 15mn. Les différentes concentrations d'alcaloïdes utilisées dans les tests d'activité antibactérienne ont été préparées dans des tubes à essais par l'addition de 0,1mg d'alcaloïdes purs dans 1ml de DMSO, puis en réalisant des dilutions au ½ pour obtenir des concentrations allant de 100µg/ml à 0,390µg/ml (Tableau VI).

**Tableau N°VI :** Gamme de concentration des alcaloïdes de *F. bastardii* et *F. capreolata*.

Dilutions	SM	D <sub>1</sub>	D <sub>2</sub>	D <sub>3</sub>	D <sub>4</sub>	D <sub>5</sub>	D <sub>6</sub>	D <sub>7</sub>	D <sub>8</sub>
Concentrations (µg/ml)	100	50	25	12,5	6,25	3,125	1,562	0,781	0,390

SM : Solution mère.

D<sub>x</sub> : Dilution.

## II-6 Evaluation de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des alcaloïdes a été évaluée à l'aide de la méthode des puits et celle des disques. Les souches bactériennes testées (Tableau VII) ont été fournies par le Laboratoire de Microbiologie Appliquée de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, université de Bejaïa. Les souches ont été revivifiées dans du bouillant nutritif, puis reisolées sur gélose nutritive pour avoir des cultures fraîches.

**Tableau N°VII :** Souches bactériennes résistantes aux antibiotiques testées.

Souches	Origine	Résistance aux antibiotiques*
<i>Staphylococcus aureus</i> S56 (Gram positif)	Urine	Souche résistante à la cefoxitine
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 604 (Gram négatif)	LCR	Souche résistante à l'imipénème (IMP) par le mécanisme d'imperméabilité (la perte de la porine D2)
<i>Escherichia coli</i> (Gram négatif)	Urine	Souche résistante aux quinolones et aux fluoroquinolones.
<i>Klebsiella pneumoniae</i> E47 (Gram négatif)	Urine	Souche productrice de $\beta$ -lactamase à spectre élargie (BLSE)

\* Les paramètres de résistance pour chaque souche ont donnés en annexe N°2. Le profile de résistance des quatre souches testées est donné dans l'annexe N°3.

L'aromatogramme est une méthode inspirée de l'antibiogramme qui permet de déterminer l'activité antibactérienne des extraits végétaux en milieu gélosé. Cette méthode a l'avantage d'être appliquée à un grand nombre d'espèces bactériennes.

### II-6-1 Méthode des disques

Elle consiste à utiliser des disques de papier imprégnés de différents produits à tester. Les disques sont déposés à la surface d'une gélose uniformémentensemencée avec la suspension bactérienne à étudier. Cette méthode a été utilisée par de nombreux auteurs pour la détermination de l'activité antibactérienne des alcaloïdes (Iwasa *et al*, 2001., Toress *et al*, 2001., Tanaka *et al*, 2003., Erdemoglu *et al*, 2007).

Le milieu Mueller-Hinton en surfusion est coulé dans des boîtes de Pétri de sorte que l'épaisseur de la gélose soit de 4mm. Après solidification de la gélose, une suspension bactérienne de  $10^8$  bactéries/ml a été préparée. Les inoculums ont été ajustés en mesurant la D.O. Des disques de papier Whatman N°3 d'un diamètre de 6mm, sont déposés à la surface de la gélose ; Chaque disque est imprégné de 10 $\mu$ l d'une solution d'alcaloïdes Des disques imprégnés de 10 $\mu$ l de DMSO sont utilisés comme témoins négatifs. Le test est répété trois fois. La lecture se fait après 18 à 24 heures d'incubation à 37°C. Le diamètre des zones est mesuré à l'aide d'une règle et les résultats sont exprimés en (mm). Une souche est dite sensible quand les diamètres des zones d'inhibition obtenus sont supérieurs à 7mm (Tores *et al*, 2001).

### **II-6-2 Méthode des puits**

Réalisée selon le protocole décrit pour la méthode des disques, mais à la place des disques on réalise à l'aide d'une baguette de verre stérile des puits sur la gélose déjàensemencée par les différentes souches bactérienne selon le protocole de Ahmad et Aqil (2006).

### **II-7 Tests de synergie entre les alcaloïdes et le Triméthoprime-Sulfaméthoxazole (SXT)**

Dans cette partie on s'est intéressé à l'étude de l'effet de synergie entre les alcaloïdes des deux espèces de *Fumaria* et SXT sur la croissance de *P. aeruginosa* 604 et *K. pneumoniae* E47. La méthode de l'antibiogramme par diffusion en milieu gélosé (méthode des disques) a été utilisée pour déterminer l'effet de synergie selon le protocole de Chattopadheya *et al* (1988) in Ahmad et Aqil (2006).

#### **II-7-1 Test de synergie sur *K. pneumoniae* E47**

Trois disques de SXT sont déposés sur la gélose déjàensemencée par *K. pneumoniae* E47. Le 1<sup>er</sup> disque de SXT est imprégné de 10 $\mu$ l d'une solution d'alcaloïde de *Fumaria bastardii* (3,125 $\mu$ g/ml). Les 2<sup>ème</sup> disque de SXT est imprégné de 10 $\mu$ l d'une solution d'alcaloïde de *Fumaria capreolata* (3,125 $\mu$ g/ml). Un 3<sup>ème</sup> disque de SXT est utilisé comme témoin négatif.

### **II-7-2 Test de synergie sur *P. aeruginosa* 604**

Réalisé selon le protocole décrit pour *K. pneumoniae* E47.

Les deux disques de SXT sont imprégnés de 10µl d'une solution d'alcaloïde avec une concentration de 25µg/ml pour les deux espèces de *Fumaria*. Un 3<sup>eme</sup> disque de SXT est utilisé comme témoin négatif.

### **II-8 Analyse statistique**

Les diamètres des zones d'inhibition représentent la moyenne des trois essais. Pour la comparaison des résultats, Statview est utilisé.



---

*Chapitre III*  
*Résultats et Discussions*

## 1- Collecte, séchage, broyage et extraction

La collecte, le séchage et le broyage du matériel végétal ont été réalisés de façon à pouvoir récupérer le maximum d'alcaloïdes, et d'avoir la meilleure activité antibactérienne. Le temps choisi pour la collecte du matériel végétal influence l'action antibactérienne des extraits des plantes, car la teneur en métabolites secondaires chez les végétaux n'est pas stable dans le temps. Nous avons collecté la partie à étudier en printemps, saison durant laquelle le pic en alcaloïdes est atteint ; l'effet du temps de collecte sur l'activité antibactérienne des extraits de plantes ayant été démontré (Suau *et al*, 2002).

La procédure de séchage est aussi un paramètre important pouvant influencer l'activité antibactérienne des extraits. En effet, un séchage mal conduit pourrait aboutir à des contaminations fongiques du matériel végétal et mener à des modifications significatives de la composition chimique et de l'activité biologique des extraits des plantes. Ce paramètre influence le taux d'extraction. Aussi, durant le séchage les membranes des organites contenant les métabolites secondaires sont détruites et ceci rend l'extraction plus efficace (Naczki et Shahidi, 2004).

## 2- Taux d'extraction des alcaloïdes

L'extraction des alcaloïdes a été réalisée dans un milieu acide. La technique de précipitation par le réactif de Mayer convient particulièrement aux alcaloïdes tertiaires et quaternaires, ceux recherchés dans notre étude (Suau *et al*, 2002). Le taux d'extraction des alcaloïdes que renferme *F. bastardii* et *F. capreolata* (tableau VIII) a été calculé en fonction de la matière végétale sèche (poudre initiale) de la partie aérienne de la plante.

**Tableau N°VIII:** Rendement en alcaloïdes totaux de *F. bastardii* et *F. capreolata*.

Plante	<i>F. bastardii</i>	<i>F. capreolata</i>
<b>Rendement d'alcaloïdes</b>	2,42%	1,17%

*F. bastardii* a fourni un taux d'environ 2,42% relativement plus élevé que celui obtenu à partir de *F. capreolata* (1,17%). La nature alcaloïdique des extraits a été confirmée par le test phytochimique, l'apparition d'un précipité orangé indique la présence d'alcaloïdes (figure 11). Les forts taux d'alcaloïdes calculés chez les deux espèces de *Fumaria* peuvent s'expliquer par la méthode d'extraction utilisée, l'utilisation du réactif de Mayer, un des réactifs de la famille des réactifs généraux des alcaloïdes, permettant la récupération des alcaloïdes totaux. Généralement, la teneur en métabolites secondaires dépend de plusieurs facteurs tels que l'espèce, l'origine, le stade de croissance, les influences environnementales et le patrimoine génétique (Bruneton, 1999).



**Figure N°11** : Précipitation des alcaloïdes par le réactif de Dragendorff.

### 3- Activité antibactérienne des alcaloïdes

Les différentes études ont montré les limites de la chimiothérapie et de la nécessité de trouver des moyens alternatifs dans le traitement des souches résistantes aux antibiotiques. Dans cette étude nous avons évalué l'activité antibactérienne des alcaloïdes de deux espèces de *Fumaria* (*F. bastardii* et *F. capreolata*) sur la croissance de quatre souches bactériennes résistantes aux antibiotiques d'origine hospitalière. Les résultats de l'activité antibactérienne exprimés par les diamètres des zones d'inhibition obtenus par la méthode des puits et celle des disques sont consignés dans les tableaux IX et X.

**Tableau N°IX** : Activité antibactérienne des alcaloïdes de *F. bastardii* et de *F. capreolata* (Méthode des puits) sur les quatre souches résistantes aux antibiotiques.

Microorganismes		Concentrations d'alcaloïdes (µg/ml)								
		100	50	25	12,5	6,25	3,125	1,562	0,781	0,390
		Zones d'inhibition (mm)*								
<i>Staphylococcus aureus</i> S56	<i>Fb</i>	26	23	21	18	17	13	10	-	-
	<i>Fc</i>	30	27	22	20	14	12	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> E47	<i>Fb</i>	30	27	24	21	16	11	-	-	-
	<i>Fc</i>	26	21	19	17	15	13	10	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 604	<i>Fb</i>	16	14	12	10	-	-	-	-	-
	<i>Fc</i>	20	16	13	10	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	<i>Fb</i>	26	22	20	17	12	10	08	-	-
	<i>Fc</i>	30	27	21	14	12	10	-	-	-

\* Le diamètre des puits est incluse (6mm).

**Fb** : *F. bastardii*. **Fc** : *F. capreolata*.

- : Pas de zone d'inhibition.

- L'aspect des zones d'inhibition obtenues par la méthode des puits est donné dans l'annexe N°4.

**Tableau N°X** : Activité antibactérienne des alcaloïdes de *F. bastardii* et de *F. capreolata* (Méthode des disques) sur les quatre souches résistantes aux antibiotiques.

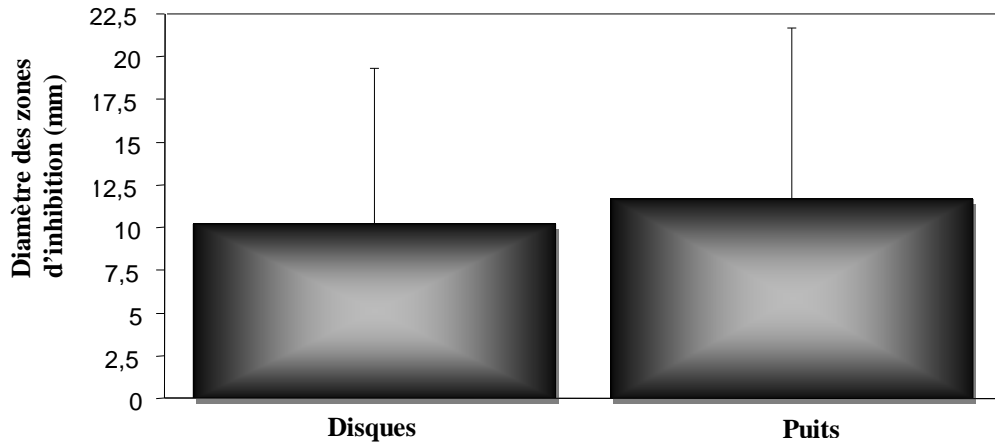
Microorganismes		Concentrations d'alcaloïdes (µg/ml)								
		100	50	25	12,5	6,25	3,125	1,562	0,781	0,390
		Zones d'inhibition (mm)*								
<i>Staphylococcus aureus</i> S56	<i>Fb</i>	27	24	22	20	17	15	12	-	-
	<i>Fc</i>	30	25	20	18	15	10	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> E47	<i>Fb</i>	29	25	22	19	16	11	-	-	-
	<i>Fc</i>	27	23	20	15	12	10	08	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 604	<i>Fb</i>	14	11	10	08	-	-	-	-	-
	<i>Fc</i>	19	12	10	09	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	<i>Fb</i>	20	15	12	11	09	08	07	-	-
	<i>Fc</i>	19	13	11	10	09	08	-	-	-

\* Le diamètre des puits est incluse (6mm).

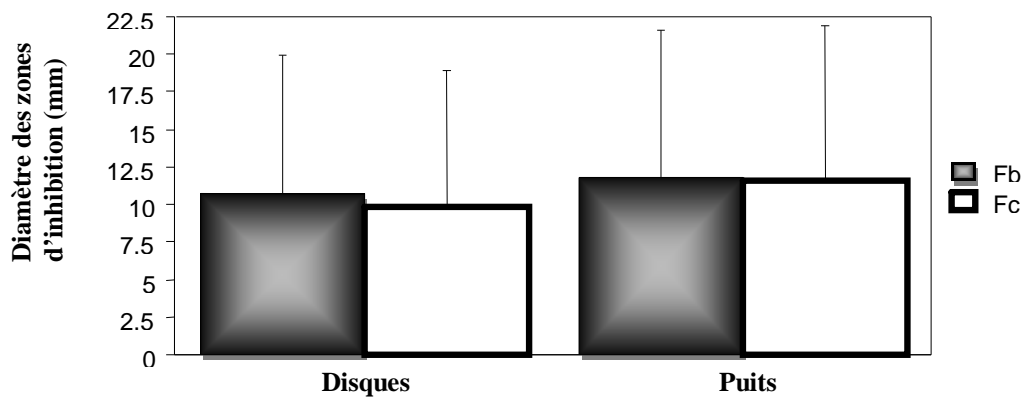
*Fb* : *F. bastardii*. *Fc* : *F. capreolata*.

- : Pas de zone d'inhibition.

L'analyse des données expérimentales montre qu'aucune zone d'inhibition n'a été constatée autour des disques et des puits chargés de DMSO et que les quatre souches bactériennes testées sont sensibles aux alcaloïdes des deux espèces de *Fumaria* (*F. bastardii* et *F. capreolata*). Sur la figure 11, on peut constater que les diamètres des zones d'inhibition obtenus par la méthode des puits sont légèrement supérieurs à ceux obtenus par la méthode des disques. Cette différence est plus remarquable avec les alcaloïdes de *F. capreolata* (figure 12).

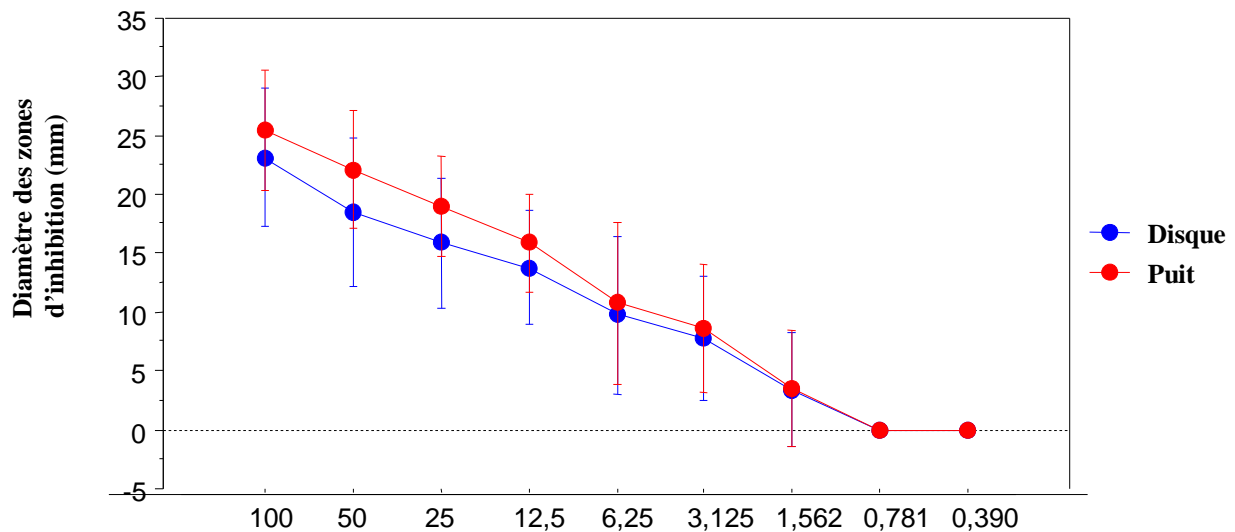


**Figure N°11 :** Diamètres des zones d'inhibition obtenus par la méthode des disques et la méthode des puits. (Le diamètre des disques et des puits n'est pas incluse).



**Figure N°12 :** Diamètres des zones d'inhibition obtenus par la méthode des disques et la méthode des puits en fonction des deux espèces de *Fumaria*. **Fb** : *F. bastardii*. **Fc** : *F. capreolata*. (Le diamètre des disques et des puits n'est pas incluse).

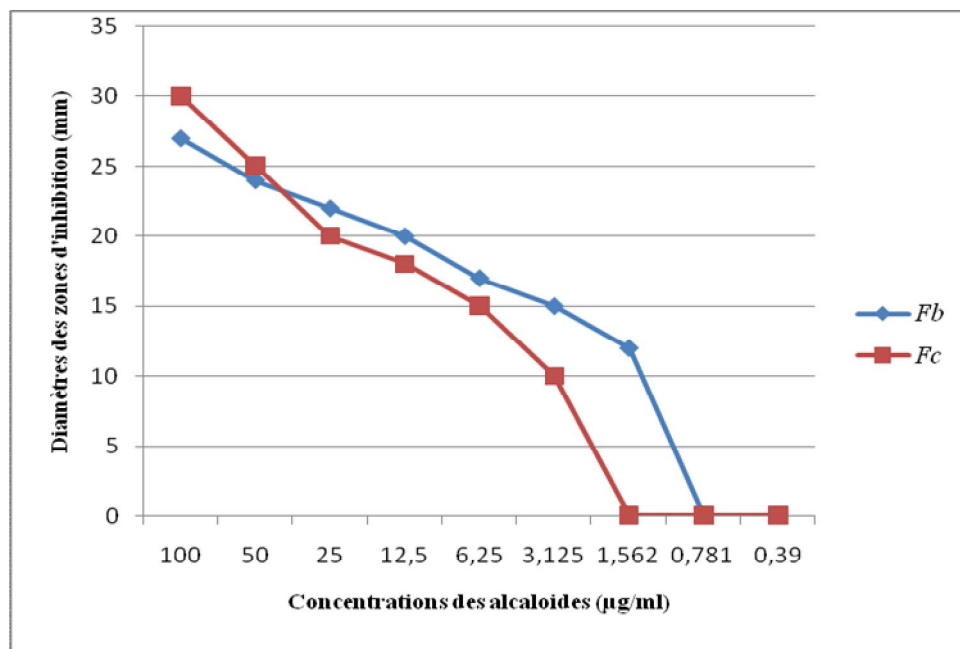
Sur la figure 13, on peut constater ainsi, que les diamètres des zones d'inhibition diminuent en fonction des concentrations en alcaloïdes. L'activité est maximale avec la concentration de (100µg/ml) et s'annule en D<sub>7</sub> (0,0781µg/ml) avec les quatre souches bactériennes testées. En analysant ce graphe, on peut le diviser en deux parties. La première montre que les concentrations 100, 50, 25 et 12,5µg/ml des alcaloïdes des deux espèces de *Fumaria* ont produit des zones d'inhibition relativement plus grandes avec la méthode des puits par rapport à la méthode des disques. Cette différence est minimale avec les concentrations allant de 6,25 à 0,781µg/ml. On remarque aussi que toutes les bactéries sont insensibles à cette dernière concentration d'alcaloïdes. La diminution des diamètres des zones d'inhibition avec les dilutions pourrait s'expliquer par une diminution de la concentration de la ou des substance (s) active (s).



**Figure N°13:** Effet des différentes dilutions des solutions d'alcaloïdes sur l'activité antibactérienne. (Le diamètre des disques et des puits n'est pas inclue).

### 3-1 Activité des alcaloïdes de *F. bastardii* et de *F. capreolata* sur *S. aureus* S56

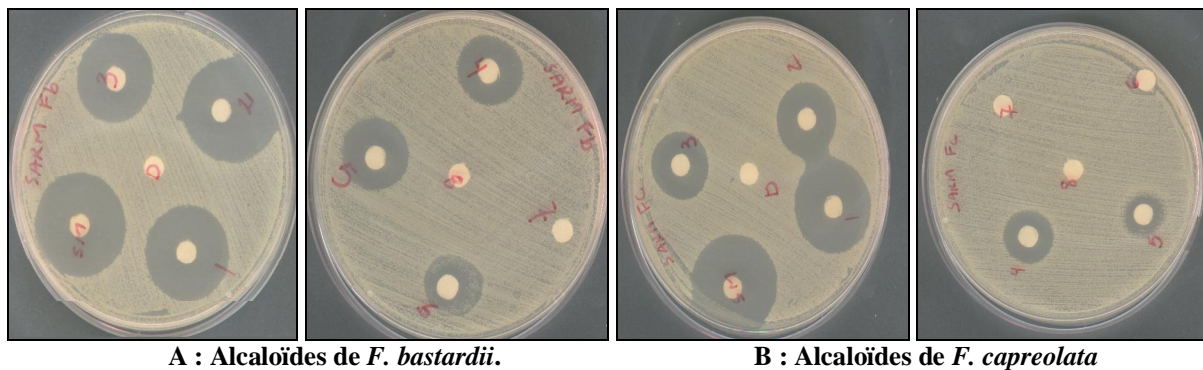
Les différentes valeurs des diamètres des zones d'inhibition obtenues ont permis de tracer les courbes de sensibilité de chaque souche à nos extraits. Les diamètres obtenus avec *S. aureus* S56 sont donnés dans la figure 14 et leurs aspects sont montrés dans la figure 15. Les alcaloïdes de *F. bastardii* et de *F. capreolata* ont un pouvoir antibactérien très important vis-à-vis *S. aureus* S56 qui a montré un comportement de sensibilité différent à l'égard des différentes concentrations d'alcaloïdes. Relativement la sensibilité de ce germe aux alcaloïdes de *F. bastardii* est plus importante que celle observée avec les alcaloïdes de *F. capreolata*. Avec la concentration de 100µg/ml, *S. aureus* S56 s'est montré plus sensible aux alcaloïdes de *F. capreolata* (30mm) qu'aux alcaloïdes de *F. bastardii* (27mm), mais à partir de D<sub>2</sub> (50µg/ml) les alcaloïdes de *F. bastardii* montrent une activité antibactérienne plus importante par rapport aux alcaloïdes de *F. capreolata*. Cette activité s'annule en D<sub>6</sub> (1,562µg/ml) pour les alcaloïdes de *F. capreolata*, mais elle persiste jusqu'à D<sub>7</sub> (0,781µg/ml) avec les alcaloïdes de *F. bastardii*. On note qu'avec la concentration de 3,125µg/ml, les alcaloïdes des deux plantes ont presque le même diamètre de zone d'inhibition (24mm avec *F. bastardii* et 25mm avec *F. capreolata*).



**Figure N°14:** Diamètres d'inhibition en fonction des concentrations d'alcaloïdes des deux espèces de *Fumaria* obtenus avec *S. aureus* S56. **Fb** : *F. bastardii*. **Fc** : *F. capreolata*. (Le diamètre des disques n'est pas inclue).



Cette importante bioactivité des alcaloïdes de *F. bastardii* et de *F. capreolata* est en relation avec leur teneur élevée en alcaloïdes isoquinoléiques. Ces composés sont connus pour leurs propriétés antimicrobiennes. La grande sensibilité de *S. aureus* aux alcaloïdes isoquinoléiques a été déjà démontrée par Iwasa *et al*, (2001). Ces auteurs ont testé un grand nombre d'alcaloïdes purs sur ce germe et ils ont démontré que les isoquinoléines simples et les benzylisoquinoléines sont les composés qui possèdent le plus large spectre d'activité antibactérienne sur *S. aureus*. D'autre part une étude précédente a montré l'effet antibactérien des dérivés de la protoberbérine sur ce germe (Iwasa *et al*, 1999).

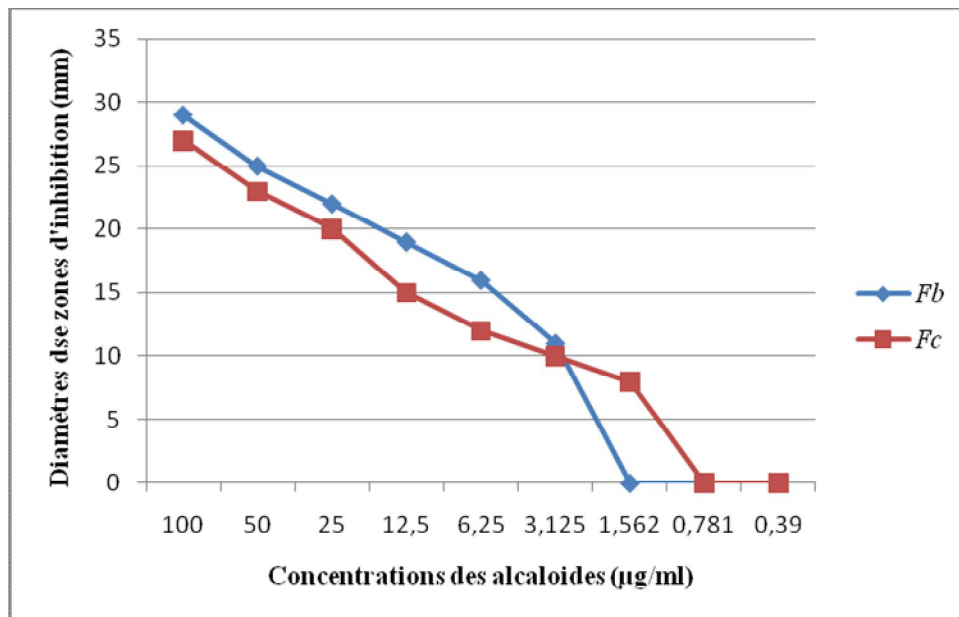


**Figure N°15:** Zones d'inhibition observées en présence des alcaloïdes des deux espèces de *Fumaria* obtenues avec *S. aureus* S56.

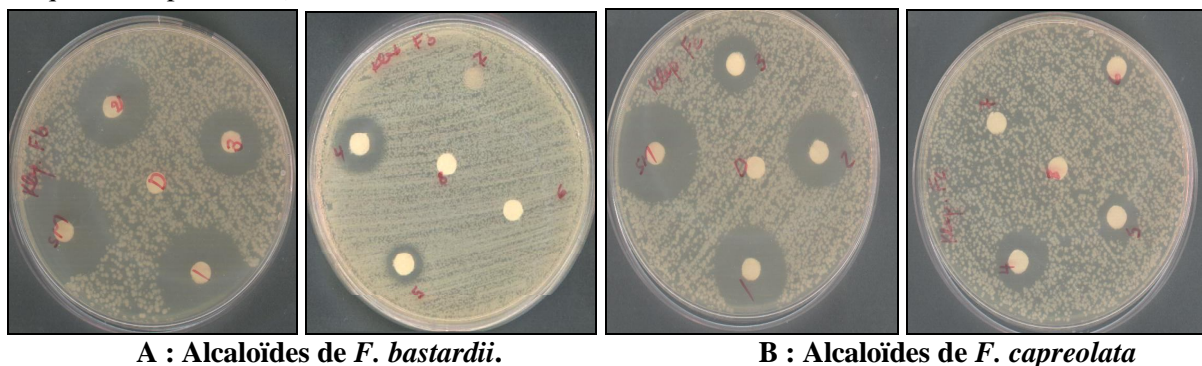
La chimiosensibilité de *S. aureus* a fait l'objet de nombreuses études. Par exemple, des zones d'inhibition de 11 à 24mm vis-à-vis *S. aureus* ATCC 25922 et de 11 à 25mm vis-à-vis *S. aureus* NTCC 8530 ont été obtenues avec 24 analogues de la berbérine (Iwasa *et al*, 1996). D'autres études ont montré la sensibilité de *S. aureus* aux alcaloïdes. En effet, sa sensibilité à l'égard des alcaloïdes de *lupinus angustifolius*, a été mise en évidence par Erdemoglu et ses collaborateurs (2007). Torres *et al* (2001), ont rapporté l'inhibition de 10 souches de SARM par quatre alcaloïdes issus d'*Arenosclera brasiliensis*. Freil *et al*, (2003) ont révélé la grande sensibilité de *S. aureus* ATCC 25923 à l'égard des différentes concentrations de berbérine isolée de *Berberis heterophylla*.

### 3-2 Activité des alcaloïdes de *F. bastardii* et de *F. capreolata* sur *K. pneumoniae* E47

Les alcaloïdes des deux espèces de *Fumaria* à différentes concentrations montrent un effet inhibiteur important vis-à-vis de *K. pneumoniae* E47 (figures 16 et 17). Les zones d'inhibition observées en présence des alcaloïdes de *F. bastardii* sont plus importantes que celles obtenues avec les alcaloïdes de *F. capreolata*. C'est ainsi qu'avec la concentration de 100µg/ml, nous notons des diamètres d'inhibition respectifs de 29 et de 27mm avec *F. bastardii* et *F. capreolata*. Toutefois à la concentration de 1,562µg/ml aucune zone d'inhibition n'est observée *F. bastardii*, par contre les extraits de *F. capreolata* à cette même concentration donnent une zone de 8mm dont l'activité s'annule à la concentration de 0,781µg/ml.



**Figure N°16:** Diamètres d'inhibition en fonction des concentrations d'alcaloïdes des deux espèces de *Fumaria* obtenus avec *K. pneumoniae* E47. **Fb** : *F. bastardii*. **Fc** : *F. capreolata*. (Le diamètre des disques n'est pas incluse).



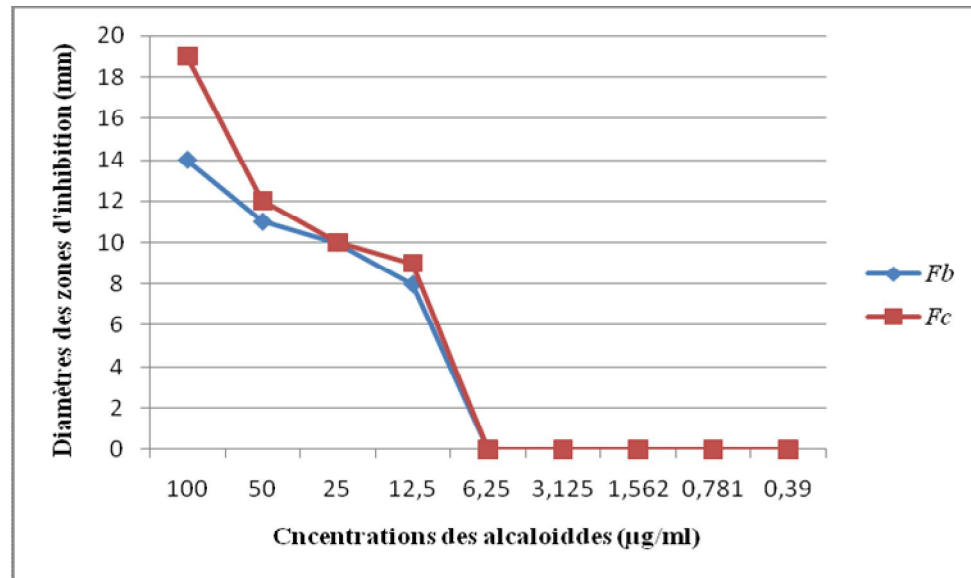
**Figure N°17:** Zones d'inhibition observées en présence des alcaloïdes des deux espèces de *Fumaria* obtenues avec *K. pneumoniae* E47.

De nombreuses études ont montré la sensibilité de *K. pneumoniae* aux extraits bruts et aux alcaloïdes des végétaux. En effet, sa sensibilité à l'égard des extraits méthanoliques de *Phytolacca dodecandra* L (14mm) et de *Plantago lanceolata* L (18mm) a été mise en évidence par Nostro et ses collaborateurs (2000). Son inhibition par les alcaloïdes de *Albertisia villosa* (23mm avec la concentration de (100µg/ml) a été signalée par Lohombo-Ekomba *et al*, (2004). Nair et ses collègues (2005) ont rapporté des zones d'inhibition de 28, 24 et 23mm respectivement avec les concentrations de 200, 100 et 50µg/ml de berbérine et des zones d'inhibition de 26, 23 et 19mm avec les mêmes concentrations de l'extrait méthanolique de *Coscinium fenestratum* avec *K. pneumoniae* MTCC 109. D'autres auteurs ont mis en évidence les propriétés antimicrobiennes des plantes. Ainsi, Bonjar (2004) a révélé la sensibilité de *K. pneumoniae* PTCC 1053 à 13 extraits des différentes plantes utilisées en médecine traditionnelle Iranienne, avec des zones d'inhibition allant de 9 à 15mm.

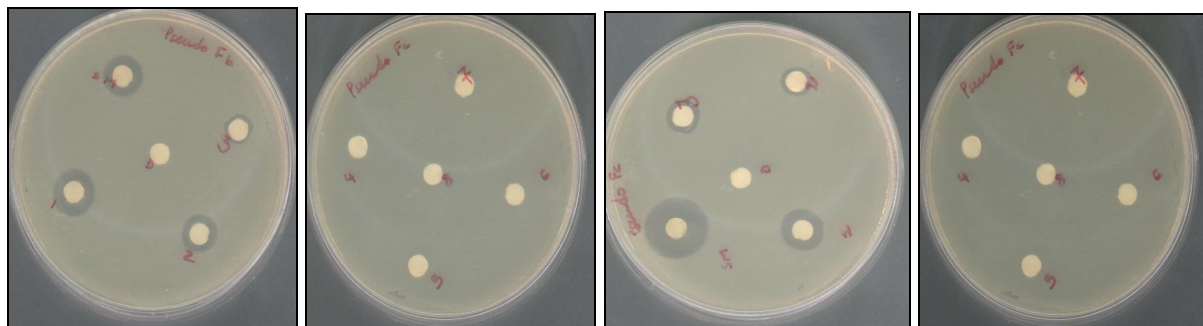
### **3-3 Activité des alcaloïdes de *F. bastardii* et de *F. capreolata* sur *P. aeruginosa* 604**

*Pseudomonas aeruginosa* 604 se présente comme la souche la moins sensible aux alcaloïdes des deux espèces de *Fumaria* par rapport aux autres micro-organismes testés (figures 18 et 19). Avec la concentration d'alcaloïdes de 100µg/ml, la zone d'inhibition obtenue avec *F. bastardii* est de 14mm, et est inférieure à celle obtenue avec les alcaloïdes de *F. capreolata* (19mm). Aux concentrations de 50, 25 et 12,5µg/ml, les alcaloïdes des deux plantes ont presque les mêmes diamètres d'inhibition. *Pseudomonas aeruginosa* 604 devient résistant à partir de la concentration de 6,25µg/ml ou aucune zone d'inhibition n'a été observée avec les alcaloïdes des deux plantes.

Il est probable que la faible sensibilité de *P. aeruginosa* 604 soit due à une différence dans la capacité de pénétration des composés actifs présents dans ces solutions d'alcaloïdes. Chez les bactéries Gram<sup>-</sup>, la membrane externe constitue une barrière de perméabilité efficace ; le lipopolysaccharide, grâce à ces charges négatives de surface, empêche la diffusion des molécules hydrophobes, et les porines excluent le passage des molécules hydrophiles de poids moléculaire élevés (Nikaido, 2003).



**Figure N°18:** Diamètres d'inhibition en fonction des concentrations d'alcaloïdes des deux espèces de *Fumaria* obtenus avec *P. aeruginosa* 604. *Fb* : *F. bastardi*. *Fc* : *F. capreolata*. (Le diamètre des disques n'est pas incluse).



**A :** Alcaloïdes de *F. bastardi*.

**B :** Alcaloïdes de *F. capreolata*

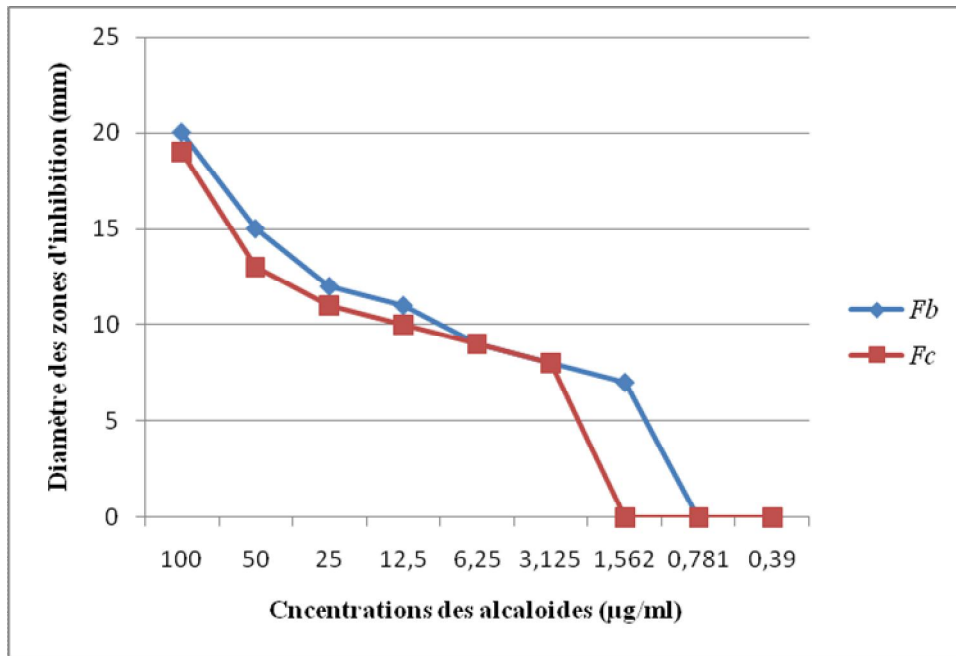
**Figure N°19:** Zones d'inhibition observées en présence des alcaloïdes des deux espèces de *Fumaria* obtenues avec *P. aeruginosa* 604.

*Pseudomonas aeruginosa* est naturellement résistante à de nombreux antibiotiques et aux extraits des plantes. Nair *et al.*, (2005) ont obtenu des zones de 10, 8 et 7mm avec les concentrations de 200,100 et 50µg/ml, alors que les mêmes concentrations de l'extrait méthanolique de *Coscinium fenestratum* sont inactives sur *P. aeruginosa* MTCC 741. Cette résistance est déjà signalée par Bonjar (2004) qui a montré la résistance de *P. aeruginosa* PTCC 1074 aux extraits de 43 espèces de 29 familles de plantes médicinales Irlandaises, ce germe ayant montré une faible sensibilité aux extraits de deux plantes seulement. Freil *et al.*, (2003) ont rapporté aussi la résistance de *P. aeruginosa* ATCC 35218 à la berbérine isolée de *Berberis heterophylla*. Nos résultats sont semblables à ceux de Lohombo-Ekomba et ses collaborateurs (2004) qui ont obtenu des zones d'inhibition de 18mm avec une concentration de 100µg/ml d'alcaloïdes d'*Albertisia villosa*.

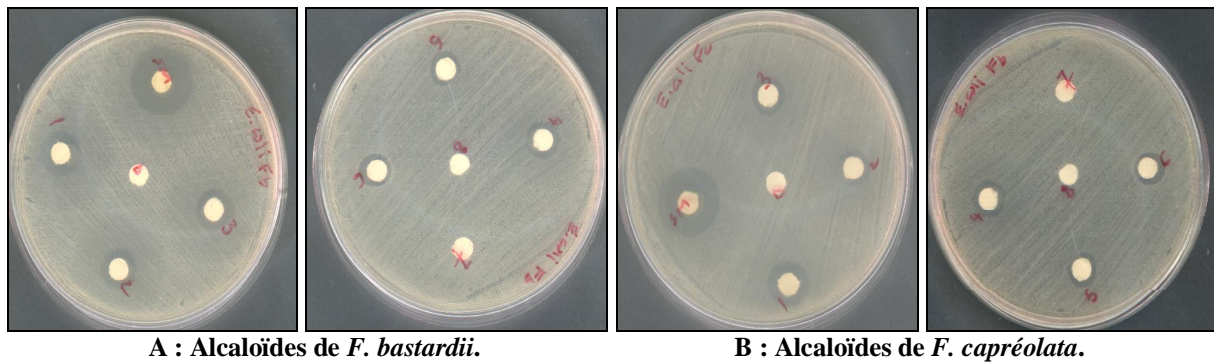
### 3-4 Activité des alcaloïdes de *F. bastardii* et de *F. capreolata* sur *E. coli*

Sur les figures 20 et 21 on peut constater, que les alcaloïdes de *F. bastardii* et de *F. capreolata* ont montré un pouvoir antibactérien considérable vis-à-vis *E. coli*. On remarque aussi que les diamètres des zones d'inhibition obtenus avec les alcaloïdes de *F. bastardii* ne diffèrent pas significativement avec ceux obtenus avec les alcaloïdes de *F. capreolata*, c'est-à-dire, que ce germe a une sensibilité presque identique vis-à-vis les alcaloïdes des deux espèces de *Fumaria*. Cette sensibilité s'annule avec la concentration de 1,562µg/ml pour les alcaloïdes de *F. capreolata* et avec la concentration de 0,781µg/ml pour *F. bastardii* mais avec une zone d'inhibition de 7mm, donc la bactérie est considérée comme étant résistante.

Nair *et al*, (2005) ont montré l'effet antibactérien de l'extrait méthanolique de *Coscinium fenestratum*. Ils ont obtenu des zones de 13, 10 et 7mm avec les concentrations de 200, 100 et 50µg/ml respectivement et des zones de 22, 20 et 16mm avec les mêmes concentrations de la berbérine sur *E. coli* MTCC 443. Ces résultats indiquent que les alcaloïdes des deux espèces de *Fumaria* ont un pouvoir antibactérien vis-à-vis *E. coli* très proche de celui de la berbérine (des zones de 19 et de 20mm ont été obtenues avec la concentration de 100µg/ml des alcaloïdes de *F. bastardii* et de *F. capreolata*). Iwasa et ses collaborateurs (1996) ont montré l'effet inhibiteur de 24 dérivés de la berbérine sur *E. coli* IFO3545, ils ont obtenus des zones d'inhibition allant de 9,5 à 12,5mm. La sensibilité de *E. coli* aux protoberbérines a été déjà démontrée par Iwasa *et al*, (1998). Ces mêmes auteurs ont montré aussi que les alcaloïdes isoquinoléiques simples et les benzyloisoquinoléines exercent une forte activité inhibitrice sur *E. coli* IFO 026. Par contre, Torres et ses collaborateurs (2001) ont révélé que *E. coli* ATCC 25922 est insensible aux quatre alcaloïdes toxiques isolés à partir d'*Arenosclera brasiliensis*.



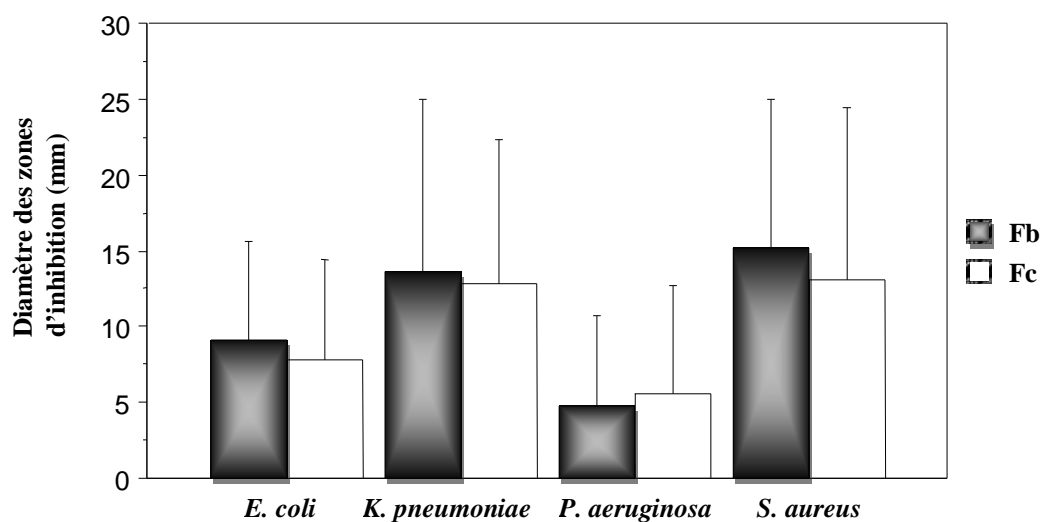
**Figure N°20:** Diamètres d'inhibition en fonction des concentrations d'alcaloïdes des deux espèces de *Fumaria* obtenus avec *E.coli*. **Fb** : *F. bastardii*. **Fc** : *F. capreolata*. (Le diamètre des disques n'est pas inclue).



**Figure N°21:** Zones d'inhibition observées en présence des alcaloïdes des deux espèces de *Fumaria* obtenues avec *E. coli*.

#### 4- Etude comparative de la sensibilité des quatre souches bactériennes

L'activité antibactérienne observée avec les différentes concentrations peut être attribuée à la composition chimique des alcaloïdes des deux plantes. En effet, dans la première partie de notre travail nous avons mis en évidence la richesse des deux espèces de *Fumaria* en alcaloïdes. Les études phytochimiques menées sur des espèces du genre *Fumaria* révèlent leur richesse en alcaloïdes isoquinoléiques (Sousek *et al*, 1999., Suau *et al*, 2002). Sur la figure 22. On peut constater ainsi, que les alcaloïdes de *F. bastardii* et de *F. capreolata* ont montré une importante activité vis-à-vis *S. aureus* S56 et *K. pneumoniae* E47 par rapport à *E. coli* et *P. aeruginosa* 604. Ce dernier germe s'est montré moins sensible que les autres micro-organismes. On remarque aussi, que les alcaloïdes de *F. bastardii* sont plus actifs sur *S. aureus*, *K. pneumoniae* E47 et *E. coli*, sauf pour *P. aeruginosa* 604 où les alcaloïdes de *F. capreolata* exercent une activité plus grande que *F. bastardii*. Le meilleur effet observé sur les trois souches bactériennes avec *F. bastardii* pourrait s'expliquer par sa richesse relative en alcaloïdes, puisque on a obtenu des taux respectifs de 2,42% pour *F. bastardii* et de 1,17% pour *F. capreolata*. L'effet de *F. capreolata* observé sur *P. aeruginosa* 604 peut être dû à un ou des composé(s) présent(s) chez cette dernière et absent(s) chez *F. bastardii*. Maiza-Benabdessellem *et al*, (2007) observent la présence de protoberberine et d'un ester d'acide phtalique chez *F. capreolata* qui sont absents chez *F. bastardii*.



**Figure N°22:** Activité antibactérienne des alcaloïdes des deux espèces de *Fumaria* sur les quatre souches testées (méthode des disques). *Fb* : *F. bastardii*. *Fc* : *F. capreolata*. (Le diamètre des disques et des puits n'est pas inclue).

Nos résultats suggèrent qu'au niveau d'un même extrait, plusieurs composés sont actifs. Ces composés exercent une inhibition relative vis-à-vis des différentes souches. Il est probable que la diminution de l'activité soit due à une modification des propriétés physico-chimiques de la ou des substance (s) responsable (s) de l'activité antibactérienne, car les extraits contiennent plusieurs composés qui peuvent interagir en solution. Ces interactions peuvent modifier des facteurs déterminants pour l'activité de la substance. Il est également probable que la diminution des diamètres des zones d'inhibition ne soit pas liée à une diminution de l'activité de la ou les substance (s) inhibitrice (s) mais uniquement à une diminution du pouvoir migratoire sur la surface de la gélose.

Cette importante bioactivité des alcaloïdes de *F. bastardii* et de *F. capreolata* est en relation avec leur teneur élevée en alcaloïdes isoquinoléiques connus pour leurs propriétés antimicrobiennes. Les alcaloïdes causent des dommages au niveau de la membrane externe des bactéries, ce qui entraîne une augmentation de la perméabilité membranaire aux protons et aux ions potassium, une réduction des réserves de l'ATP intracellulaire, une perturbation de la force protons motrice et une dénaturation des protéines intracellulaires. Pour d'autres bactéries, le mécanisme de la toxicité des alcaloïdes est fondé principalement sur l'inhibition des enzymes (Iwasa *et al*, 2001).



## 5- Test de synergie

Les différentes valeurs obtenues sont consignées dans les tableaux XI et XII. D'après les figures 23 et 24 on observe la résistance des *K. pneumoniae* E47 et de *P. aeruginosa* 604 vis-à-vis SXT. Cette résistance se traduit par l'absence d'une zone d'inhibition autour des disques de SXT. On note un effet de synergie entre les alcaloïdes de *F. bastardii* et le SXT sur *K. pneumoniae* E47, il se traduit par l'élargissement de la zone d'inhibition de 11mm avec la concentration de 3,125µg/ml à 15mm dans le cas du mélange alcaloïde-SXT. On remarque l'absence de synergie entre les alcaloïdes de *F. bastardii* et le SXT sur *P. aeruginosa* 604 (le diamètre de 10mm n'a pas changé). Dans le cas des alcaloïdes de *F. capreolata* on observe un effet de synergie sur *P. aeruginosa* 604, avec la concentration de 25µg/ml d'alcaloïde on obtient une zone de 10mm, cette zone est de 12mm dans le cas du mélange alcaloïde-SXT. Ce dernier n'a aucun effet de synergie sur *K. pneumoniae* E47.

**Tableau N°XI : Synergie entre les alcaloïdes de *F. bastardii* et SXT.**

Bactérie	SXT	C <sub>1</sub>	SXT+ C <sub>1</sub>	Synergie
<i>Klebsiella pneumoniae</i> E47	-	11	15	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 604	-	10	10	-

- : Pas de zone d'inhibition.

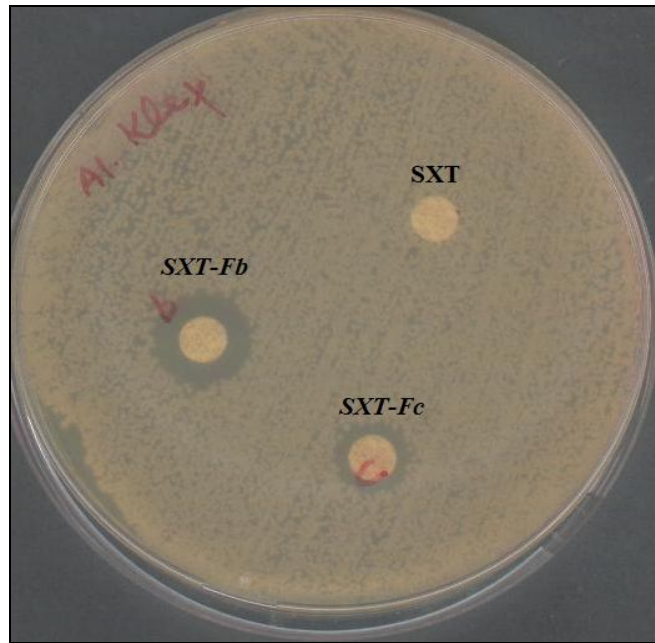
C<sub>1</sub> : Concentration d'alcaloïde (3,125µg/ml).

**Tableau N°XII : Synergie entre les alcaloïdes de *F. capreolata* et SXT.**

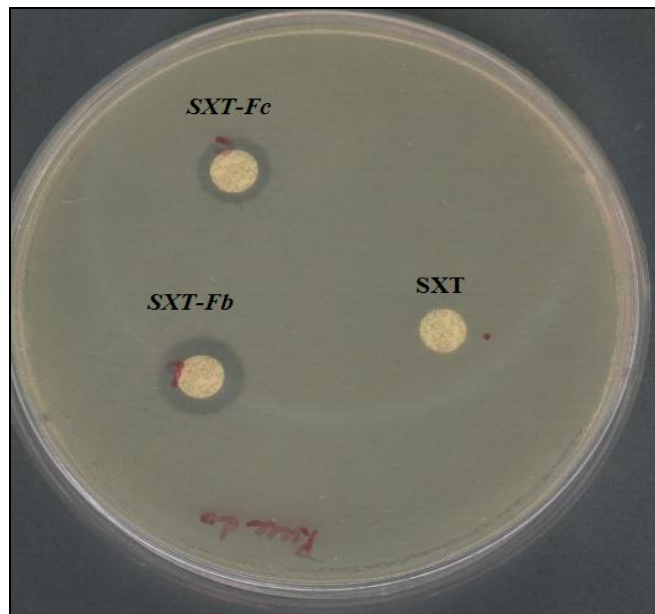
Bactérie	SXT	C <sub>2</sub>	SXT+ C <sub>2</sub>	Synergie
<i>Klebsiella pneumoniae</i> E47	-	10	10	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 604	-	10	12	+

- : Pas de zone d'inhibition.

C<sub>2</sub> : Concentration d'alcaloïde (25µg/ml).



Figures N°23: Effet de synergie entre les alcaloïdes des deux plantes sur *K. pneumoniae* E47.



Figures N°24: Effet de synergie entre les alcaloïdes des deux plantes sur *P. aeruginosa* 604.

Les sulfonamides forment un groupe de molécules de structure analogue à l'acide para-amino-benzoïque (APAB). Ils agissent en compétition avec l'APAB pour le site actif de la dihydroptéroate synthétase. Il s'agit d'une enzyme qui catalyse une réaction essentielle à la production des purines et des pyrimidines pour la synthèse des acides nucléiques. Les sulfonamides sont surtout utilisés en combinaison avec le triméthoprim (analogue à la pyrimidine et inhibiteur de la dihydrofolate réductase) pour former le triméthoprim-sulfaméthoxazole (SXT) et on obtient un effet de deux niveaux de blocage dans la chaîne de synthèse des acides nucléiques.

Les sulfamides et le triméthoprim ont été utilisés pendant plusieurs décennies en tant qu'agents antibactériens efficaces, chez l'animal et chez l'homme. Cependant, la résistance à ces deux agents s'est propagée largement et rapidement. Ceci a surtout été dû à la propagation horizontale de gènes de résistance exprimant des variants des enzymes cibles dihydroptéroate synthase et dihydrofolate réductase insensibles aux sulfonamides et triméthoprim, respectivement. Deux gènes, *sul1* et *sul2*, portés par des transposons et des plasmides, et exprimant des dihydroptéroate synthases hautement résistantes aux sulfamides, ont été trouvés. Pour le triméthoprim, une vingtaine de gènes de résistance, phylogénétiquement séparés, exprimant des dihydrofolates réductases insensibles à l'antibactérien, ont été caractérisés (Sold, 2001).

L'effet de synergie entre les alcaloïdes des deux espèces de *Fumaria* et SXT pourrait être dû à une interaction inhibitrice entre les alcaloïdes et les deux enzymes mutées (la dihydroptéroate synthase et la dihydrofolate réductase insensibles à l'action de SXT) et les enzymes non mutées seront inhibées par le SXT. L'augmentation de la sensibilité de *P. aeruginosa* 604 sous l'effet de l'association SXT-alcaloïdes (*Fc*) et l'absence de synergie sur la même bactérie dans le cas du mélange SXT-alcaloïdes (*Fb*), argumente l'hypothèse de la présence de molécules actives sur *P. aeruginosa* 604 dans les alcaloïdes de *F. capreolata* et l'absence de ces molécules chez *F. bastardii*.



---

# *Conclusion*

### Conclusion générale

Le présent travail a été consacré à l'extraction des alcaloïdes de deux espèces de *Fumaria* (*F. bastardii* et *F. capreolata*). Il a fait aussi l'objet de la détermination de l'activité antibactérienne des alcaloïdes de ces plantes médicinales vis-à-vis quatre souches bactériennes d'origine hospitalière par la méthode des disques et celle des puits.

*F. bastardii* a fourni un taux d'environ 2,42% relativement plus élevé que celui obtenu à partir de *F. capreolata* (1,17%). L'évaluation de l'effet antibactérien montre que les alcaloïdes des deux plantes ont une grande activité antibactérienne sur les souches testées. Nous constatons qu'il n'y a pas de différence significative entre les résultats obtenus par les deux méthodes (disques et puits). *S. aureus* S56 et *K. pneumoniae* E47 ont montré un comportement de sensibilité plus important que celui de *E. coli* et de *P. aeruginosa* 604. Ce dernier germe s'est montré le moins sensible par rapport aux autres souches testées, il est naturellement résistant à de nombreux antibiotiques et aux extraits de plantes. Une diminution du pouvoir antibactérien (en termes de diamètres des zones d'inhibition) suite à la diminution de la concentration en alcaloïdes a été observée avec les quatre souches bactériennes testées. Les alcaloïdes de *F. bastardii* ont un effet inhibiteur plus important sur *S. aureus* S56, *K. pneumoniae* E47 et *E. coli* par rapport aux alcaloïdes de *F. capreolata*. Une exception a été observée avec *P. aeruginosa* 604. L'association des alcaloïdes avec le SXT a révélée une synergie entre les alcaloïdes de *F. bastardii* et le SXT sur *K. pneumoniae* E47 et une synergie entre les alcaloïdes de *F. capreolata* sur *P. aeruginosa* 604.

La grande activité inhibitrice des alcaloïdes des deux espèces de *Fumaria* sur le développement bactérien de quatre souches résistantes aux antibiotiques laisse entrevoir des perspectives dans plusieurs domaines industriels ; pharmaceutiques, cosmétiques, alimentaires, etc. Nous estimons que des travaux plus approfondis devraient être poursuivis pour l'isolement et l'identification du principe actif responsable de cette activité antibactérienne pour vérifier si l'on est sur la voie d'une ou d'un ensemble de molécules de grande efficacité pour le traitement des souches résistantes aux antibiotiques.

## *Références bibliographiques*

## Références bibliographiques

**Ahmad I, Aqil F** (2007)- in vitro efficacy of bioactive extracts of 15 medicinal plants against ES $\beta$ L- producing multidrug- resistant enteric bacteria. *Microbiological Research*. (162), p: 264-275.

**Bruneton J** (1999)- pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 3<sup>ème</sup> Edition Technique et documentation Lavoisier : 784-873.

**Bonjar S** (2004)- Evaluation of antibacterial properties of some medicinal plants used in Iran. *Journal of Ethnopharmacologie*. (94), p: 301-305.

**Bush K** (1995)- A functional classification scheme for B-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother*. (39), p: 1211-1233.

**Charlier P, Coyette J, Dehareng D, Dive G, Duez C, Dusart J** (1998)- Résistance bactérienne aux B-lactamines. *Médecine/Science*. (14), p : 544-555.

**Debuigne G** (1991)- Dictionnaire des plantes qui guérissent. *Edition Larousse*. p : 74.

**Erdemogulu N, Ozkan S, Tosun F** (2007)- Alkaloid profile and antimicrobial activity of *Lupinus brasiliensis* alkaloid extract. *Phytochem Rev*. (6), p: 197-201.

**Henquell C, Chanal C, Siroit D, Labiat R, Siroit J** (1995)- Molecular characterization of nine different types of mutants among 107 inhibitor resistant TEM B-lactamases from clinical isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. (93), p: 427-430.

**Houghton P.J et Raman A** (1998)- Laboratory Hand book for Fractionation of Natural Extract. *Chapman et Hall, Londres*. P: 29-31.

**Jarlier V** (2000)- Mécanismes de résistance aux antibiotiques. *Précis de bactériologie clinique*. (32), p: 597-608.

**Jarlier V, Nordmann P** (2000)- Entérobactéries et b-lactamines. *Précis de bactériologie clinique*. ( ), p: 649-651.

**Leclercq R** (2000)- Résistance des staphylocoques aux antibiotiques. *Club D'infectiologie*. (21), p : 375-385.

**Levy S.B** (2005)- Antibiotic resistance- the problem intensifies. *Advanced Drug Delivery*. (57), p: 1446-1450.

**Liden M** (1986)- Synopsis of *Fumariodeae* (*Papaveraceae*) with a monograph of the tribe *Fumariaceae*. *Opera Botanica*. (88), p: 130-133.



- Mauer P** (1963)- Une propriété inconnue du réactif de Mayer. *Mikrochim. Acta.* p: 254-258.
- Marek R, Humpa O, Dostal J Slavik J, Sklenar V** (1999) – <sup>15</sup>N NMR study of isoquinoline alkaloids. *Magne Reson. Chem.* (37), p: 195-202.
- Naczki M et Shahidi F** (2004)- Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of chromatography.* (1054), p: 95-111.
- Nikaido H** (1985)- Role of permeability barrier in résistance to B-lactam antibiotics. *Pharmacol Ther.* (27), P: 197-231.
- Pages G, Gornolel E** (2003)- Perméabilité membranaire et résistance aux antibiotiques chez les bactéries à Gram négatif. *Revue française des laboratoires.* (352), P : 57-63.
- Quezel P et Santa S** (1963)- Nouvelle Flore de l'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales. *Edition CNRS*, P : 383-384.
- Richter G** (1993) – Les composés phénolique. Métabolisme des végétaux (physiologie et biochimie). Edition Dunod. P : 317-339.
- Salinas M.J, Romero A.T, Blanca G, De la Herran R, Garrido- Ramos M, Suarez V** (2003)- Contribution to the Taxonomy and Phylogeny of *Sacocapnos*. (*Fumariaceae*). *Plant Systematic Evolution.* (237), p: 153-164.
- Shakil A** (1998) –Isolation and structural elucidation of chemical constituents from *Fumaria indica* , *Ferula oopoda* and *Withania somnifer*. These de doctorat. International center for chemical recherche, university of Karachi.
- Souseck K.J, Guedon D, Adam T, Bochorakova H, Taborska E, Valka I, Simanek A** (1999)– Alkaloids and organic acids content of eight *Fumaria* species. *Phytochemical analysis.* (10), p: 6-11.
- Stahl E, Dumont E, Jork H, Kraus L.J,Rozumek K.E, Schorn P.J** (1975)– Analyse Chromatographique et Microscopique des drogue- Manuel pratique pour les pharmacopées, Entreprises Moderne. *Edition Techniques et Documentation, Paris*, p: 23-31.
- Suau R, Cabezudo B, Ricor R, Lopez-Romero J.M, Najera F** (2002)– Alkaloids from *Fumaria sepium* and *Fumaria agrarian*. *Biochemical systematic and Ecology.* (30), p: 263-265.
- Suau R, Cabezudo B, Ricor R, Lopez-Romero J.M, Najera F** (2002)– Direct determination of alkaloids contents in *Fumaria* species by GC-MS. *Phytochem Anal.* (13), p: 363-367.
- Tanaka J.C.A, da Silva C.C, de Oliveira A.J.B, Nakamura C.V, Diasfilho B.P** (2006)- Antibacterial activity of indole alkaloids from *Aspidosperma ramiflorum*. *Brasilian Journal of Medical and Biological Research.* (39), p: 387-391.

**Torres V.R, Berlinck G.S, Nascimento G.F, Fortier S.C, Pessoa C, Moraes M.O** (2002)- Antibacterial activity against resistant bacteria and cytotoxicity of four alkaloid toxins isolated from the marine sponge *Arenosclera brasiliensis*. *Toxicon*; (40), p: 885-891.

**Tenover (2006)**- Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Association for professionals in infection control and epidemiologie*. (34), p: 53-60.

**Trias J, Dufersne J, Levesque R, Nikaido H** (1989)- Decreased outer membrane permeability in imipinem-résistant mutant in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. (33), p: 1201-1206.

**Yala D, Merad A.S, Mohamedi D, Ouarkorich M.N** (2001)- Résistance bactérienne aux antibiotiques. *Médecine du Magreb*. (91), p : 13-14.

# *Glossaire*

## *Glossaire médical*

- **Analgésique** : variété de médicaments qui permettent d'atténuer, voire de supprimer la douleur.
- **Anesthésique**: toute substance capable d'entraîner la suspension plus ou moins complète non seulement de la sensibilité générale mais aussi de celle d'un organe ou seulement d'une partie de corps.
- **Antidépresseur** : nom générique de diverses substances employées comme tranquillisant et possédant d'autre part des propriétés sédatives, hypnotiques (facilitant en théorie le sommeil) anticonvulsivantes ou amnésiantes (inhibant la mémoire).
- **Antifongique**: médicament actif contre les champignons.
- **Anti-inflammatoire** : il s'agit d'un groupe de médicaments destinés à traiter une réaction inflammatoire et les maladies qui en résultent telles que manifestations rhumatismales.
- **Anti-HIV** : il s'agit d'un groupe de médicaments destinés à traiter le SIDA, maladie causée par le virus HIV.
- **Anti-malarien** : médicament utilisé pour lutter contre le malaria (paludisme).
- **Antimicrobiens** : médicament utilisé pour traiter des maladies microbiennes.
- **Antimutagène** : médicament utilisé pour traiter des certaines mutations.
- **Antirhumatismales** : médicament utilisé dans les cas du rhumatisme.
- **Bactériostatique** : Substances qui s'oppose au développement et à la reproduction des microbes, sans les tuer. Cas de certains sulfamide et antibiotiques.
- **Dépuratif** : qui purifie l'organisme, qui élimine les toxines ou les poisons.
- **Diurétique** : terme caractérisant de façon générale ce qui augmente la sécrétion urinaire.
- **Germicides** : produit qui détruit les germes. On utilise des agents physiques (radiation, froid,...), des antibiotiques,...
- **Spasmolytique** : synonyme de antispasmodique, Médicament possédant la capacité de combattre les spasmes (contractures, crampes, convulsions).
- **Vasodilatateur** : médicament utilisé pour augmenter le diamètre des vaisseaux sanguins.

## *Glossaire botanique*

- **Actinomorphe** : synonyme de régulier. se dit d'une fleur régulière à symétrie axiale.
- **Alterné** : qualifie des bourgeons ou des feuilles isolées, attachées alternativement une par une sur la tige à des niveaux différents.
- **Angiosperme** : du grec angeion, vas, et sperma, graine, (Graine dans un boîte) : classe des « plantes à fleur » (phanérogames) dont les graines sont enfermées dans un fruit.
- **Arille** : excroissance ayant pour origine le tégument, expansion ou enveloppe extérieure d'une graine, parfois charnue, constituant un faux fruit.
- **Bilabié** : qualifie un calice ou une corolle dont les éléments sont divisés et soudés en deux lèvres inégales.
- **Bisannuelle** : qualifie une plante vivant deux années. la première, celle de son semi, elle donne une rosette des feuilles, et parfois des fleurs, et constitue des réserves. elle produit une tige florale et fleurit la deuxième année à la belle saison en produisant de nouvelles graines.
- **Cormophyte** : végétale qui possède un cormus (appareil végétative) avec au moins une tige.
- **Dicotylédone** : qualifie une végétale dont la plantule a deux cotylédons. s'oppose à monocotylédone.
- **Epi** : Inflorescence (groupe de fleurs) indéfinie simple, effilée et généralement dressée, formée par des fleurs sessiles ou subsessiles très voisines échelonnée autour d'un même axe central et directement fixés sans pédicelle ou avec un pédicelle très court.
- **Étamine** : Un des organes sexuels mâles de la fleur qui contient le pollen.
- **Hermaphrodite** : Qualifie une plante portant des fleurs avec les organes des deux sexes, mâles (étamines) et femelles (carpelles). La majorité des plantes à fleur est hermaphrodite.
- **Pétale** : Élément de la corolle d'une fleur, en général très voyant et très coloré, situé entre les sépales et les organes reproducteurs.
- **Pétiolée** : Prolongation étroite de la tige portant une feuille ou les folioles, le rachis

- **Silique** : Assez semblable à une gousse, mais provenant de deux carpelles formé de deux pièces appliquée contre une mince cloison membraneuse médiane portant les grains séparés par un lien.
- **Stipule** : Du latin *stipula*, petite tige : appendice membraneux ou foliacé, ou écaille situé à la base du pétiole foliaire et en général présent par paire.
- **Zygomorphe** : Qualifie une fleur irrégulière à symétrie bilatérale et non axiale, s'oppose a actionomorphe.

# *Annexes*

## Annexe 1 : Matériel et produits utilisés

### 1- Appareillages utilisés

- Bain-marie MEMMERT
- Balance de précision BP 310P
- Broyeur KILA LABORATECHNIK M20
- Etuve BINDER BD 53
- Spectrophotomètre UV- Visible Analytikjena SPECCORD 50
- Tamiseur RETSH AS 53.

### 2- Produits chimiques

- Acide chlorhydrique : HCl, 37,6%, M= 36,46 g/ mol, d = 1, 185 (PROLABO).
- Chlorure d'Aluminium : AlCl<sub>3</sub>, 6H<sub>2</sub>O, M= 241,43 g/ mol, (PROLABO).
- Ether diéthylique: C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, M= 74, 12 (PROLABO).
- Méthanol: CH<sub>3</sub>OH, 99%, M= 32, 04 g/ mol, d = 0, 79 (PROLABO).

## 3- Réactifs

### A- Réactif de Mayer

Iodure de potassium (25g), Chlorure mercurique (6.77g), Eau distillée (1000ml).

### B- Réactif de Dragendorff

Iode (38.2g), Carbonate de Bismuth (20.8g), Iodure de potassium (200g), Eau distillée (1000ml).

#### **1- Bouillant nutritif**

Maceration de viande	15g
Peptone trypsique	5g
NaCl	

Ph 7,7

#### **2- Gélose Mueller Hinton**

Infusion de viande de bœuf	300g
Hydrolysat de caséine	17,5g
Amidon	1,5g
Agar	17g

Ph 7,4



**Annexe 2 : Paramètres de résistance des quatre souches testées.**

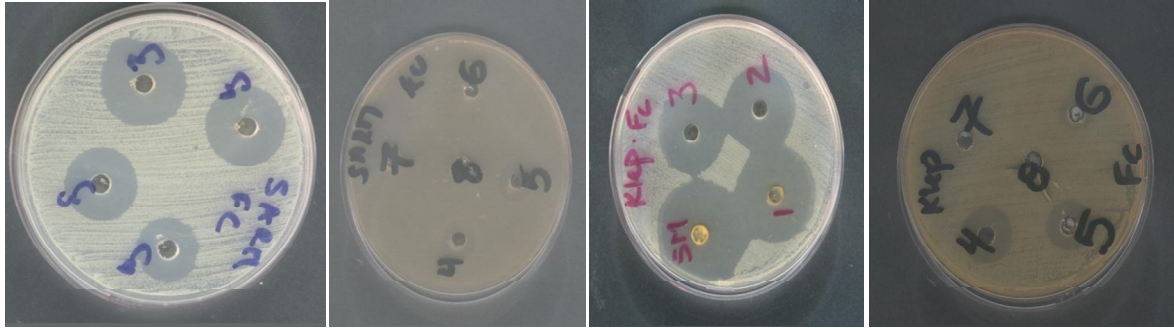
**Diamètres des zones édités par le CFA – SFM, 2007**

<b>Antibiotiques</b>	<b>Abréviation</b>	<b>S</b>	<b>R</b>	
Cefotaxime	CTX	≥ 21	< 15	
Céftazidime	CAZ	≥ 21	< 15	
Céfamandole	MA	≥ 22	< 15	
Céfuroxime	CXM	≥ 22	< 15	
Cefoxitine	FOX	≥ 22	< 15	
Imipénème	IMP	≥ 21	< 17	
Pipéracilline	PIP	≥ 20	< 12	
Pipéracilline + Tazobactam	TZP	≥ 21	< 14	
Amoxicilline + clavulanate	AMC	≥ 21	< 14	
Ticarcilline	TIC	≥ 22	< 18	
Ticarcilline + clavulanate	TCC	≥ 22	< 18	
Gentamicine	GM	≥ 16	< 14	
Chloramphénicol	C	≥ 23	< 19	
Triméthorpime-Sulfaméthoxazole	SXT	≥ 16	< 10	
Ciproflaxacine	CIP	≥ 22	< 19	
Acide nalidixique	NA	≥ 20	< 15	
Oflaxacine	OFX	≥ 25	< 22	
Norfloxacine	NOR	≥ 25	< 22	
Triméthorpime	TMP	≥ 16	< 12	
Kanamycine	K	≥ 17	< 15	
Tétracycline	TET	≥ 19	< 17	
<i>Stahylococcus</i> <i>ssp</i>	Cefoxitine	FOX	≥ 27	< 25
	Erythromycine	E <sub>15</sub>	≥ 22	< 17
	Vancomycine	Va	≥ 17	-

**Annexe 3** : Profile de résistance des quatre souches testées.

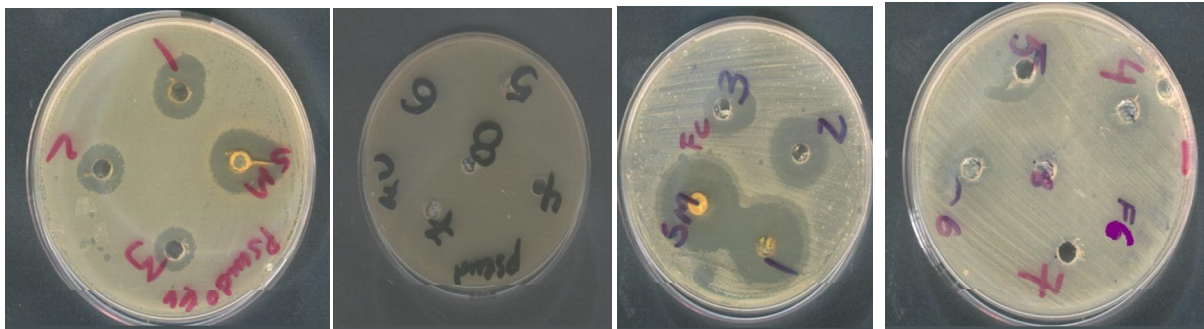
Souches	Antibiogramme		
<i>E.coli</i>	<b>β-lactamines</b> (Céftazidime, Cefotaxime)		S
	<b>Quinolones</b> (Acide nalidixique)		R
	<b>Fluoroquinolones</b> (Ciproflaxacine, Ofloxacine, Norfloxacine)		R
<i>K.pneumoniae</i> E47	β-lactamines	Cefotaxime	S
		Céftazidime	I
		Cefoxitine	I
		Pipéracilline + Tazobactam	I
		Ticarcilline + clavulanate	R
		Amoxicilline + clavulanate	R
		Ticarcilline, Pipéracilline, Céfuroxime, et Céfamandole.	R
<i>P.aeruginosa</i> 604	<b>β-lactamines</b> (FOX, IMP, CPO, CTX, CCTX, CAZ)		R
	<b>Aminosides</b> (Gentamicine, Kanamycine)		R
	<b>Quinolones</b> (Acide nalidixique)		R
	<b>Sulfamide</b> (Triméthorpime, Triméthorpime-Sulfaméthoxazole)		R
	<b>Autre</b> (Tétracycline, Chloramphénicol)		R
<i>S.aureus</i> S56	Cefoxitine		R
	Erythromycine		S
	Vancomycine		S
	Tétracycline		S
	Triméthorpime-Sulfaméthoxazole		S

**Annexe 4 :**



*Staphylococcus aureus*

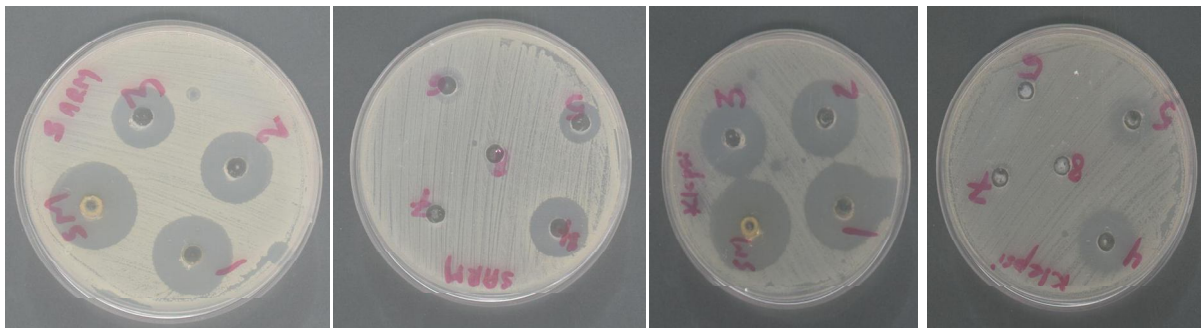
*Klebsiella pneumoniae*



*Pseudomonas aeruginosa*

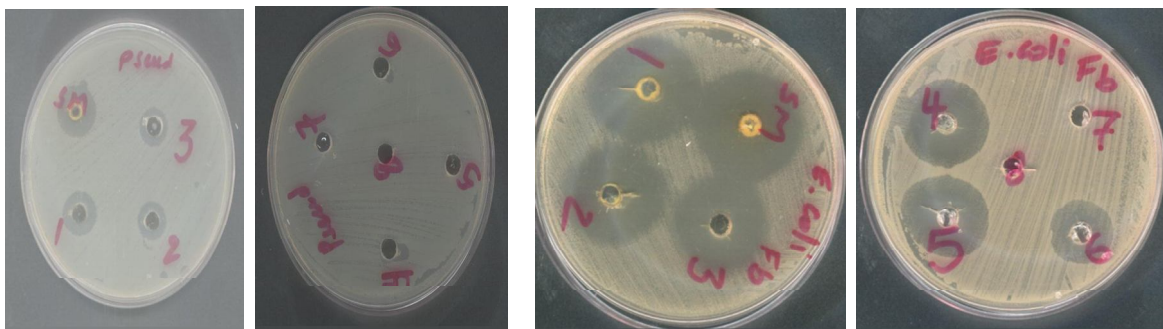
*Escherichia coli*

**Figure :** Activité antibactérienne des alcaloïdes de *F. capreolata* (méthode des puits).



*Staphylococcus aureus*

*Klebsiella pneumoniae*



*Pseudomonas aeruginosa*

*Escherichia coli*

**Figure :** Activité antibactérienne des alcaloïdes de *F. bastardii* (méthode des puits).

## Résumé

L'activité antibactérienne des alcaloïdes de deux plantes médicinales *Fumaria bastardii* et *Fumaria capreolata* a été évaluée par deux méthodes de diffusion sur gélose, la méthode des puits et celle des disques, contre quatre souches bactériennes résistantes aux antibiotiques d'origine hospitalière (*S. aureus* S56, *K. pneumoniae* E47, *P. aeruginosa* 604 et *E. coli*).

*Fumaria bastardii* a fourni un taux d'alcaloïdes d'environ 2,42% relativement plus élevé que celui obtenu à partir de *F. capreolata* (1,17%). L'évaluation de l'effet antibactérien montre que les alcaloïdes des deux plantes ont une grande activité antibactérienne sur les souches testées. *P. aeruginosa* 604 s'est montré le moins sensible par rapport aux autres souches testées. Un effet de synergie a été observé entre les alcaloïdes de *F. bastardii* et le SXT sur *K. pneumoniae* E47 et entre les alcaloïdes de *F. capreolata* et le SXT sur *P. aeruginosa* 604.

**Mots clés :** Activité antibactérienne, alcaloïdes, *Fumaria bastardii*, *Fumaria capreolata*, Bactéries résistantes aux antibiotiques. Méthodes de diffusion sur gélose.

## Abstract

The antibacterial activity of alkaloids of two medicinal plants *Fumaria bastardii* and *Fumaria capreolata* was evaluated by two methods of diffusion, the method of the wells and that of the discs, against four bacterial stocks resistant to antibiotics of hospital origin (*S. aureus* S56, *K pneumoniae* E47, *P. aeruginosa* 604 and *E coli*). *Fumaria bastardii* provided an alkaloid rate from approximately 2,42% relatively higher than that obtained starting from *F. capreolata* (1,17%). The evaluation of the antibacterial effect shows that the alkaloids of the two plants have a great antibacterial activity on the stocks tested. *P. aeruginosa* 604 was shown the least sensitive compared to the other stocks tested. An effect of synergy was observed between alkaloids of *F. bastardii* and the SXT on *K pneumoniae* E47 and between alkaloids of *F. capreolata* and the SXT on *P. aeruginosa* 604.

**Keywords:** Antibacterial activity, alkaloids, *Fumaria bastardii*, *Fumaria capreolata*, Bacteria resistant to antibiotics. Methods of diffusion.

## المخلص

المفعول المضاد الحيوي لنبتتين طبيئتين *Fumaria capreolata* و *Fumaria bastardii* تم تقييمه بطريقتي الانتشار على سطح الجيلوز، أربعة سلالات من البكتيريا المقاومة للمضادات الحيوية (*S. aureus* S56, *K pneumoniae* E47, *P. aeruginosa* 604 and *E coli*) مصدرها المستشفيات. *Fumaria bastardii* تحتوي على نسبة تقارب 2,42% من الألكالويدات أكبر من الكمية المستخلصة من *Fumaria capreolata* (1,17%). تبين هذه الدراسة أن الألكالويدات هاتين النبتتين لهما فعالية كبيرة تجاه الأربعة سلالات من البكتيريا وتعتبر *P. aeruginosa* 604 الأقل حساسية من بقية السلالات البكتيرية. الجمع بين الألكالويدات و SXT أثبت وجود تعاون وظيفي بين الألكالويدات و *Fumaria bastardii* و SXT ضد *K pneumoniae* E47. وبين SXT و الألكالويدات و *Fumaria capreolata* ضد *P. aeruginosa* 604.

**كلمات أساسية:** المضاد الحيوي، الألكالويدات، طريقة الانتشار، البكتيريا المقاومة للمضادات الحيوية، *Fumaria capreolata*, *Fumaria bastardii*.