

Chapitre II : L'activité antibactérienne des alcaloïdes et mécanisme d'action de la berbérine

II.4. La berbérine

La berbérine est l'un des alcaloïdes à effet antibactérien dont le mécanisme d'action est le plus connu, elle a été choisie donc dans ce travail pour l'étude des mécanismes d'actions des alcaloïdes contre les bactéries d'autant plus que la grande diversité des alcaloïdes, rend difficile d'étudier tout les mécanismes de leurs effet antibactérien. La berbérine est un alcaloïde isoquinoléique avec une longue histoire dans la médecine chinoise et nord américaine, il est présent essentiellement chez les espèces botaniques : *Hydrastis canadensis* , *Coptis chinensis* , *Berberis aquifolium* , *Berberis vulgaris*, et *Berberis aristata* .Elle peut se rencontrer au niveau des racines, rhizomes, et dans l'écorce des tiges (Stermitz et al .,2000). Les figures 14,15 ,16 et 17 sont quelques exemples de plantes contenant la berbérine.



Figure 14: Photo de *Berberis vulgaris* (Stermitz et al ., 2000).



Figure 15: Photo de *Berberis fremontii* (Stermitz et al., 2000).



Figure 16: Photo de *Berberis repens* (Stermitz et al., 2000).



Figure 17: Photo de *Berberis aquifolia* (Stermitz et al., 2000).

II.4.1. Propriétés physico-chimiques de la berbérine

- Les structures chimique et tridimensionnelle :

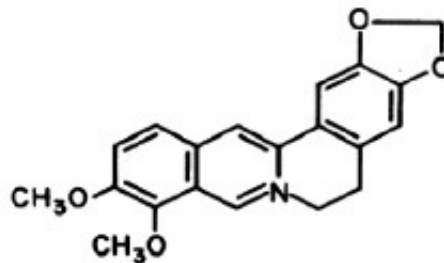


Figure 18: Structure chimique de la berbérine (Sack et Froehlich ,1982).

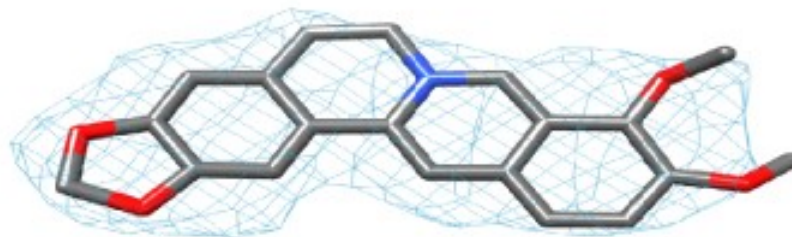


Figure 19 : Structure tridimensionnelle de la berbérine (Marta et al., 2011).

- Formule chimique : C₂₀H₁₈O₄N
- Appellation chimique : 7, 8, 13,13a-tetrahydro-9,10-dimethoxy-2,3-methylenedioxy – berberinium
- Couleur : Jaune.
- Solubilité : Eau
- Poids moléculaire : 336,36
- Point de fusion : 210 0C.
(Maiti et kumar ,2010).

II.4.2.L'activité antibactérienne de la berbérine

La berbérine agit sur des bactéries Gram positives et Gram négatives. Une concentration de 2 mg/ml est nécessaire à la berbérine pour inhiber toute croissance de *Escherichia coli*, elle agit aussi sur d'autres bactéries comme : *Staphylococcus aureus* avec une C.M.I de 0,1 mg/ml , *Bacillus subtilis* avec une C.M.I de 0,2 mg/ml , *Proteus vulgaris* avec une C.M.I de 1 mg/ml , *Salmonella typhimurium* avec une C.M.I de 2 mg/ml , et sur *Pseudomonas aeruginosa* avec une C.M.I de 2 mg/ml (JIN JL et al ., 2010).

II.4.3.Mécanisme de l'action antibactérienne de la berbérine

La berbérine exerce son action antibactérienne à plusieurs niveaux : 1)-L'inhibition de la réplication de l'ADN et de la transcription de l'ARN, 2)- L'inhibition de la protéine FTsZ, 3)- Inhibition et/ou influence d'enzymes bactériennes, 4)-déstabilisation des échanges ioniques ,et 5)-inhibition de l'adhérence bactérienne aux cellules eucaryotes (Sun et al .,1988 ; Domadia et al ., 2008 ; Boberek et al .,2010 ; Jin JL et al., 2010)

II.4.3.1.Inhibition de la réplication de l'ADN et de la transcription de l'ARN

La berbérine possède la capacité de se lier aux acides nucléiques bactériens. La liaison se fait par intercalation entre deux paires de bases et d'une façon non spécifique (Yamagishi, 1967 ; Park et al., 2004 ; Jin JL et al.,2010). La figure 20 montre les cinétiques de liaison de la berbérine aux acides nucléiques de *Bacillus subtilis* obtenues par Jin JL et ces collaborateurs en 2010, et la figure 21 montre la liaison de la berbérine à une séquence de l'ADN bactérien en 3D.

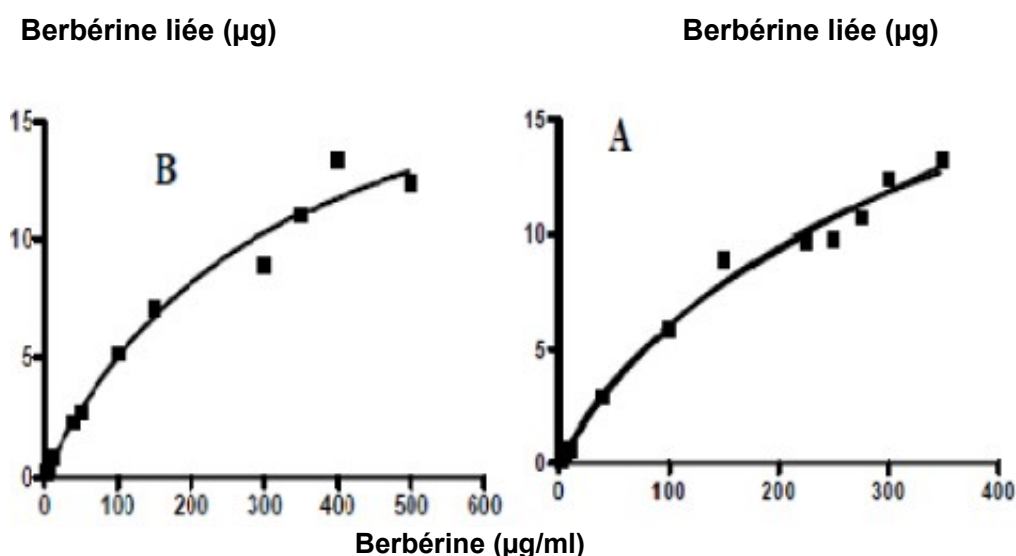


Figure 20: Les cinétiques de liaison de la berbérine à l'ADN (courbe B), et à l'ARN (courbe A) de *Bacillus subtilis* (Jin JL et al ., 2010)

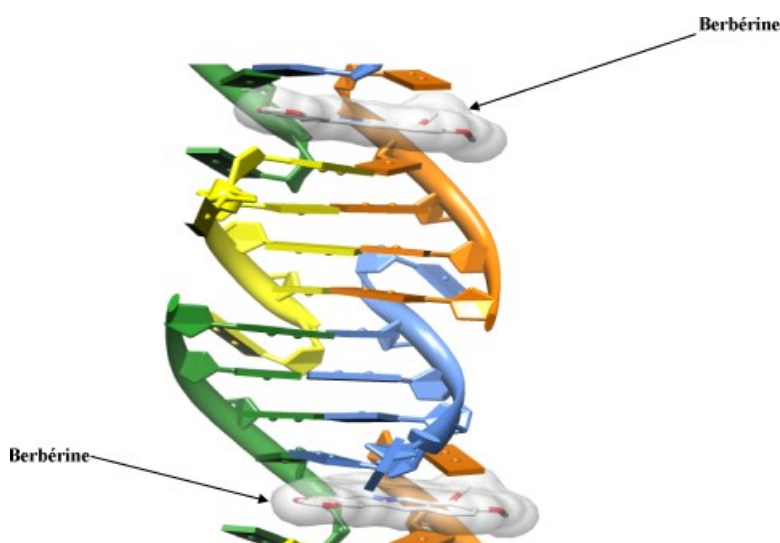


Figure 21 : Structure tridimensionnel du complexe ADN-berbérine (Marta et al., 2011).

La capacité de la berbérine à inhiber la duplication de l'ADN et la transcription de l'ARN est due à l'inhibition de l'ADN gyrase et de l'ARN polymérase. La berbérine peut également causer des modifications et/ou des déformations dans la structure des acides nucléiques (Jin JL et al., 2010 ; Maiti et Kumar ,2010).

II.4.3.2. Inhibition de la protéine FTsZ

La protéine FTsZ (Figure 22) est l'élément clé de la division bactérienne, elle est l'homologue de la tubuline chez les eucaryotes, et elle a une activité GTPase. FTsZ est une protéine de poids moléculaire 44 000 présente chez les eubactéries et les archaebactéries et qui polymérise sous forme de filaments (Figure 23) en présence du GTP et des ions Mg²⁺ pour former l'anneau Z au milieu de la cellule bactérienne (Figure 24), lui permettant ainsi de se diviser (Kumar et al., 2011 ; Zhiru et al., 2011)

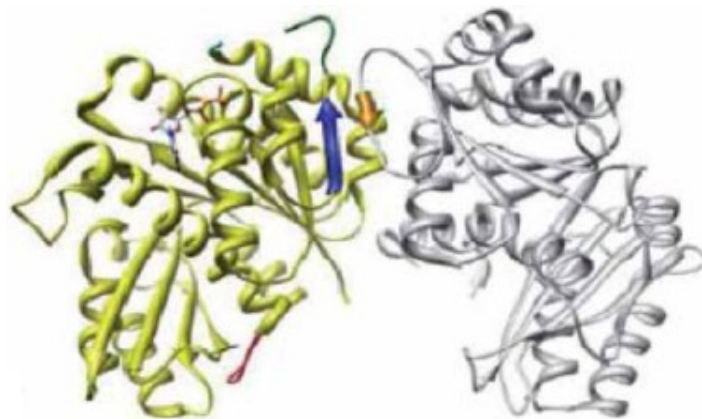


Figure 22: La structure tridimensionnelle de la protéine FTsZ (Kumar et al ., 2011).

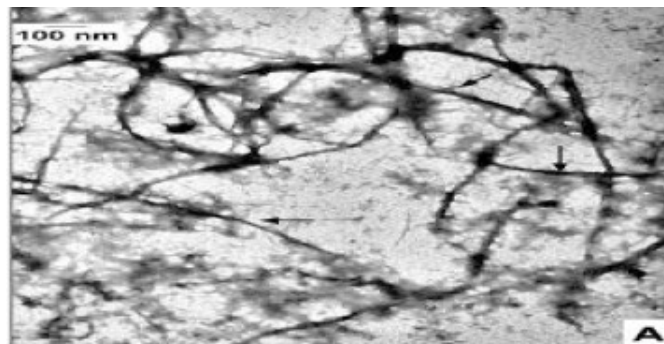


Figure 23: La polymérisation de FTsZ. Les flèches indiquent les protofilaments de la protéine (Domadia et al ., 2008).

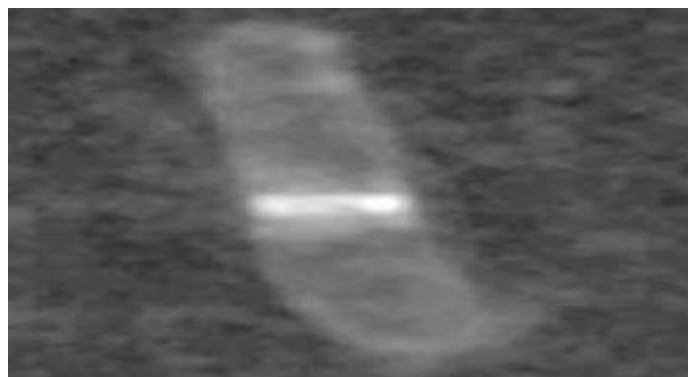


Figure 24: cellule bactérienne en cours de division : l'anneau Z apparait brillant au centre de la cellule (Zhiru et al ., 2011).

L'action inhibitrice de la berbérine sur FTsZ s'exerce par un contact physique direct entre les deux molécules (Figure 25), la berbérine se lie au voisinage du site de liaison du GTP de la protéine (Figure 26), le contact de la berbérine avec les acides aminés localisés dans le voisinage du site de liaison du GTP (Figure 27), entraîne des modifications structurales dans ce dernier, ce qui a comme conséquences l'inhibition de l'activité GTPase de FTsZ et de sa polymérisation (Figure 29), et le blocage toute division bactérienne après désorganisation de l'anneau Z (**Kumar et al., 2011**).

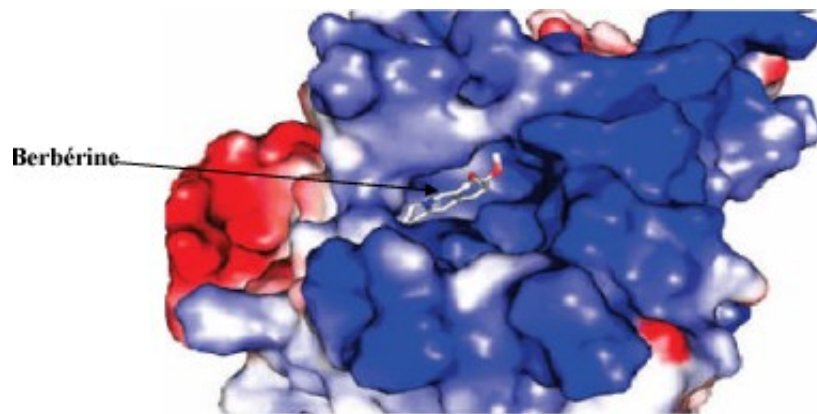


Figure 25: Structure tridimensionnelle de la liaison entre la berbérine et FTsZ (**Domadia et al., 2008**).

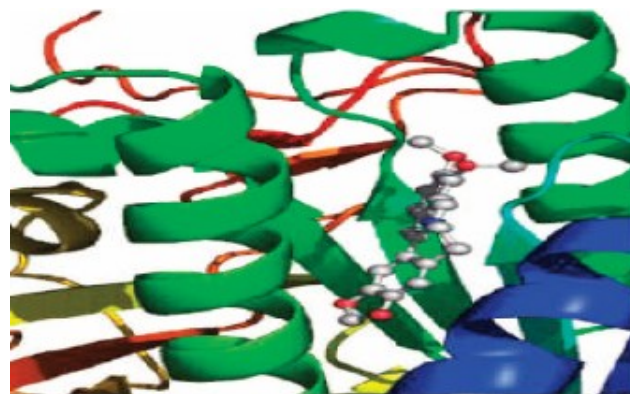


Figure 26: La berbérine liée au voisinage du site de liaison du GTP dans la protéine FTsZ (**Domadia et al., 2008**).

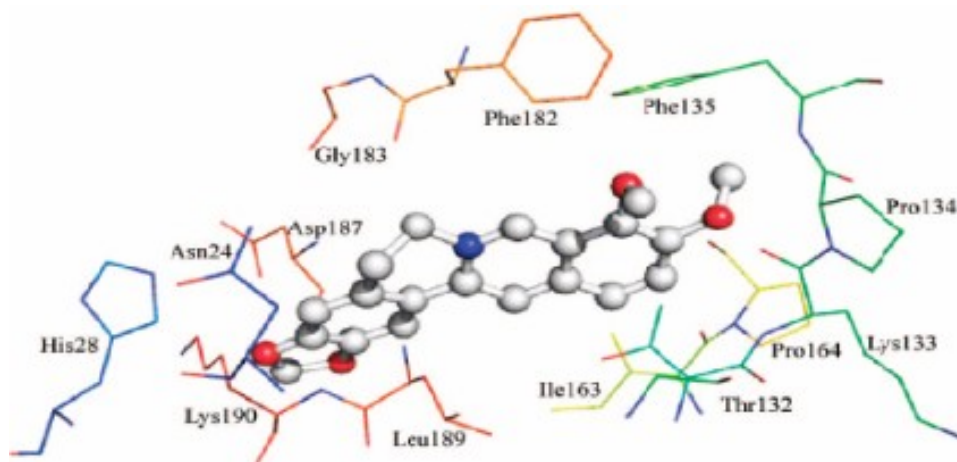


Figure 27: le site actif de la berbérine dans la protéine FTsZ (au voisinage du site de liaison du GTP) (**Domadia et al., 2008**)

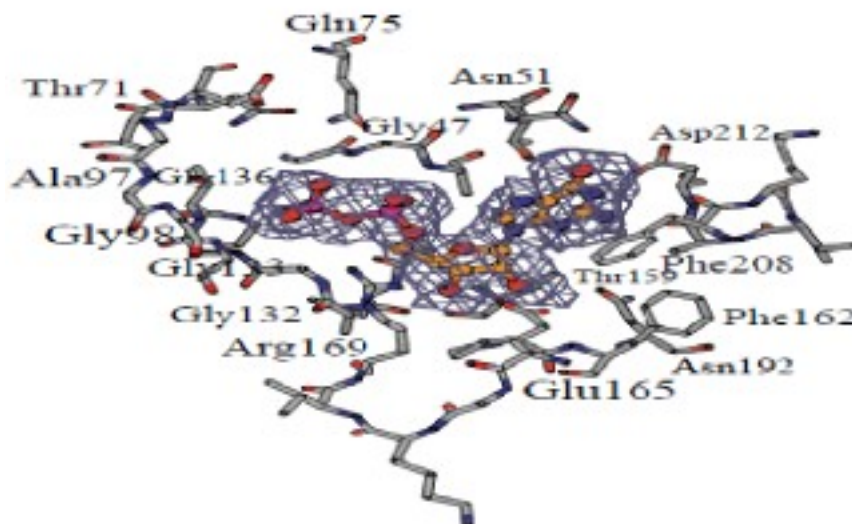


Figure 28: Le site actif de la protéine FTsZ (Lowe et Linda ,1998).

% de polymérisation de FTsZ

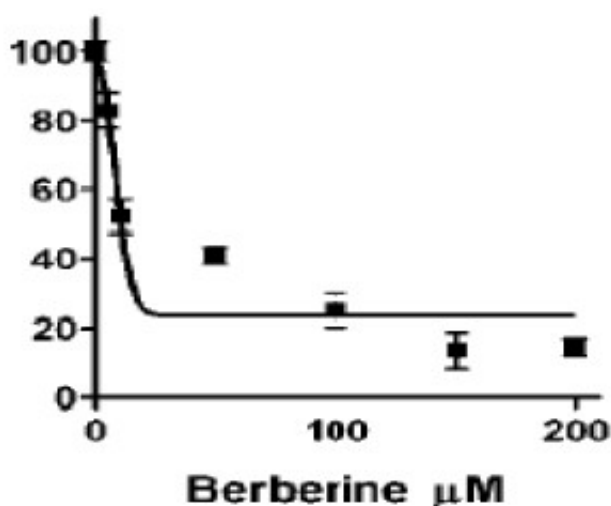


Figure 29: Inhibition de la polymérisation de FTsZ de Escherichia coli par la berbérine (Domadia et al., 2008).

II.4.3.3. Inhibition d'enzymes bactériennes

La berbérine influence et/ou inhibe l'activité de certaines enzymes bactériennes ayant un rôle indispensable dans les fonctions de la cellule bactérienne comme l'inhibition de la reverse transcriptase (Gudima et al.,1994), la malate et de la lactate déshydrogénase (Kap et whithely ,1991), la lipase (Gripa et al.,1999), la monoamine oxydase (Ro et al.,2001), et la télomerase (Sriwilaijareon et al.,2002) .L'effet inhibiteur et/ou déstabilisateur de la berbérine vis-à-vis de ces enzymes peut s'expliquer soit génétiquement par l'inhibition de l'ADN ou de l'ARN codants pour ces enzymes ,ou par une inhibition de leurs fonctions par contact direct (Jin JL et al.,2010).

II.4.3.4. Déstabilisation des échanges ioniques

En 2010 Jin JL et ses collaborateurs ont démontrés une augmentation anormale de la quantité des ions K^+ et Ca^{2+} relâchée par Escherichia coli traitée par la berbérine (Figure 31) ; les changements morphologiques de la surface cellulaire de la même bactérie traitée par la berbérine (Figure 30-D), peut expliquer cette déstabilisation qui peut être due a des modifications de surface cellulaire et par conséquent perturbations des canaux et des voies permettant les échanges de ces ions.

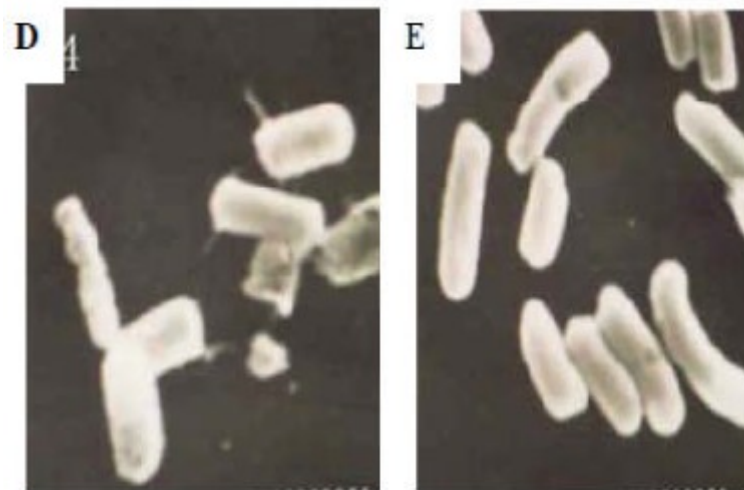


Figure 30: Photos de Escherichia coli non traitée par la berbérine (E), et traitée par la berbérine (D) (Jin JL et al., 2010).

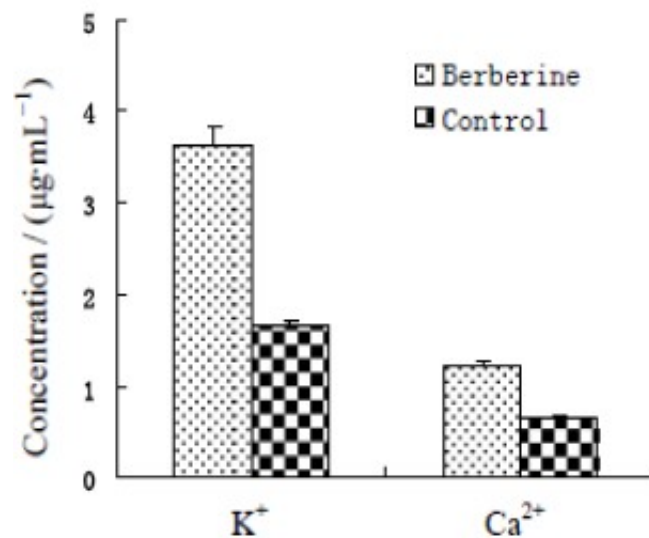


Figure 31: Concentration de k⁺ et de Ca²⁺ relâchés par Escherichia coli traitée ou non par la berbérine (Jin JL et al., 2010).

II.4.3.5. Inhibition de l'adhérence bactérienne aux cellules eucaryotes

En 1988 deux études effectuées par Sun et ses collaborateurs ont démontrées que la berbérine bloque l'adhésion de Escherichia coli aux cellules épithéliales (tableau III), et de Streptococcus pyogenes aux cellules épithéliales, à l'hexadécane et à la fibronectine (Figure 32).

Tableau III : Influence de la berbérine sur l'adhérence de Escherichia coli aux cellules épithéliales (Sun et al., 1988).

Berberine (µg/ml)	Perte de l'adhérence (%)
0	0
50	41±0,7
100	76±1,5
200	86±3,1
300	90±2,6

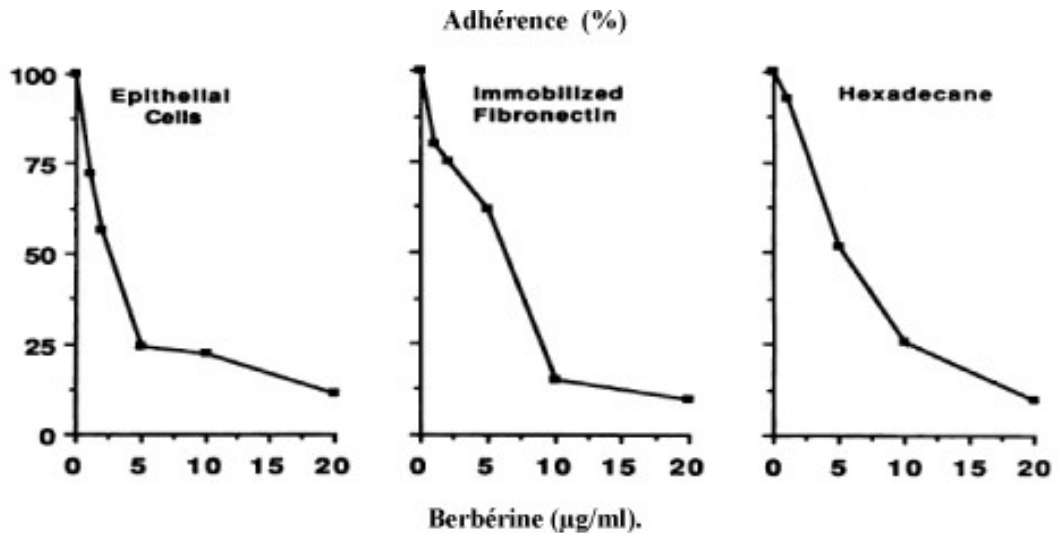


Figure 32: Influence de la berbérine sur l'adhérence de streptococcus pyogenes aux cellules épithéliales, fibronectine et à l'hexadécane (Sun et al., 1988).

Sun et al ont prouvés que le blocage de l'adhésion de Escherichia coli aux cellules épithéliales est due à l'inhibition de l'expression des pilis qui assurent l'adhésion des bactéries aux cellules notamment de type eucaryotes (Figure 33).

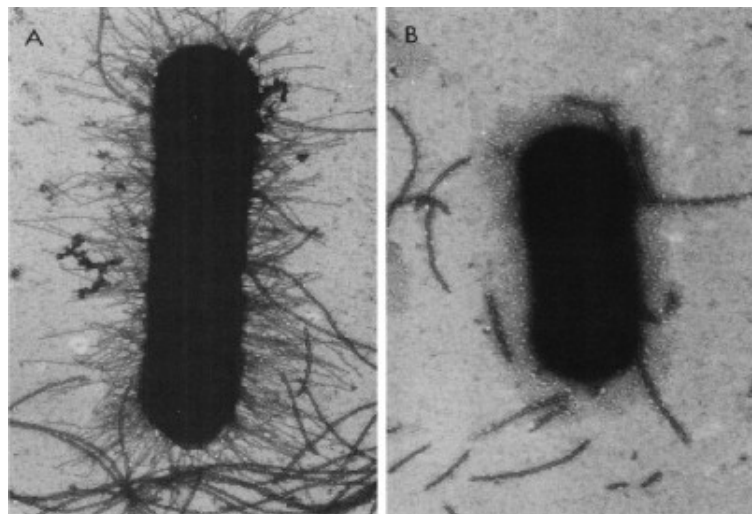


Figure 33: Influence de la berbérine dans l'expression des pilis de Escherichia coli. (A) :E.coli non traitée par la berbérine. (B) : E.coli traitée par la berbérine (Sun et al., 1988)

Pour le mode de l'inhibition de l'adhérence de Streptococcus pyogenes aux cellules épithéliales, fibronectine et à l'hexadécane , Sun et al ont prouvés que c'est due à l'inhibition de l'acide lipotechoïque (Figure 34) qui est la molécule majeure de l'adhérence de la bactérie étudiée.

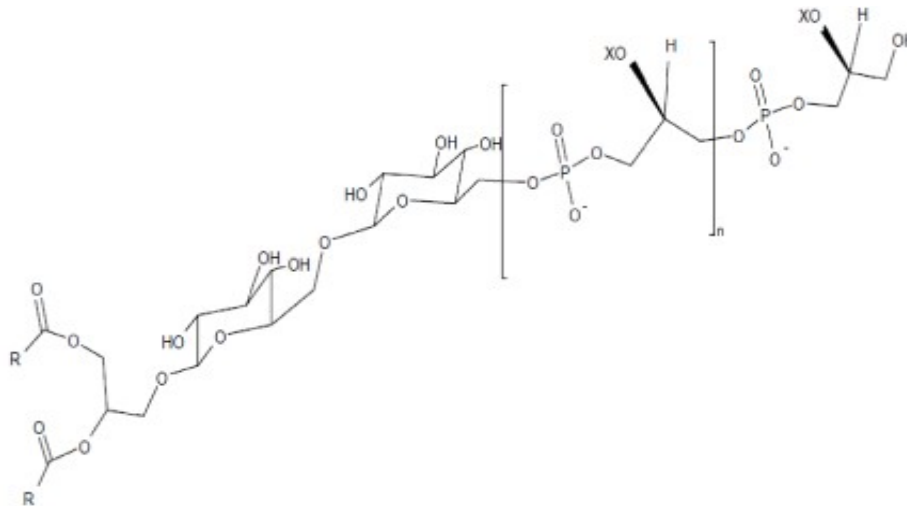


Figure 34: La structure chimique de l'acide lipoteichoïque. (R) : C₁₆H₃₄, (X) : H , glucosamine , ou D-Alanine , (n) : environ 22 unités de snglycérol-1-phosphate (Morath et al ., 2002).

II.4.4.La potentialisation de l'activité antibactérienne de la berbérine

II.4.4.1.Le système d'efflux bactérien

Le système d'efflux bactérien est un mécanisme de défense majeur contre les antibiotiques. Il est composé de deux types de pompes à efflux qui sont des transporteurs membranaires : les « transporteurs drogue-spécifiques » impliqués dans la résistance contre une seule classe d'antibiotiques comme les pompes Tet qui effluent exclusivement les tétracyclines ou les pompes Mef spécifiques des macrolides, et les pompes MDR (Multi Drug Resistance pumps) qui ciblent l'exportation de différentes molécules antibactériennes et contribuent ainsi à l'émergence de bactéries « multi-résistantes ». Les pompes protéiques localisées à la surface de la bactérie exportent l'antibiotique et le maintient à des concentrations sub-toxiques. Chez les bactéries Gram négatives, les systèmes d'efflux sont des complexes protéiques constitués d'une pompe membranaire, d'une protéine périplasmique de jonction (MFP :Membrane Fusion Protein), et d'une porine enchâssée dans la membrane externe (OMP : Outer Membrane protein). Chez les bactéries Gram positives, le système d'efflux n'est constitué que de la pompe. Les pompes à efflux sont divisées en cinq familles : MFS (Major Facilitator Superfamily), SMR (Small Multidrug Resistance), RND (Resistance-Nodulation cell Division), MATE et ABC. Les pompes MFS,SMR,et RND utilisent l'énergie fournie par un gradient de protons pour fonctionner, les pompes MATE utilisent un gradient de sodium tandis que les pompes ABC utilisent l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP (Guinoiseau ,2010).

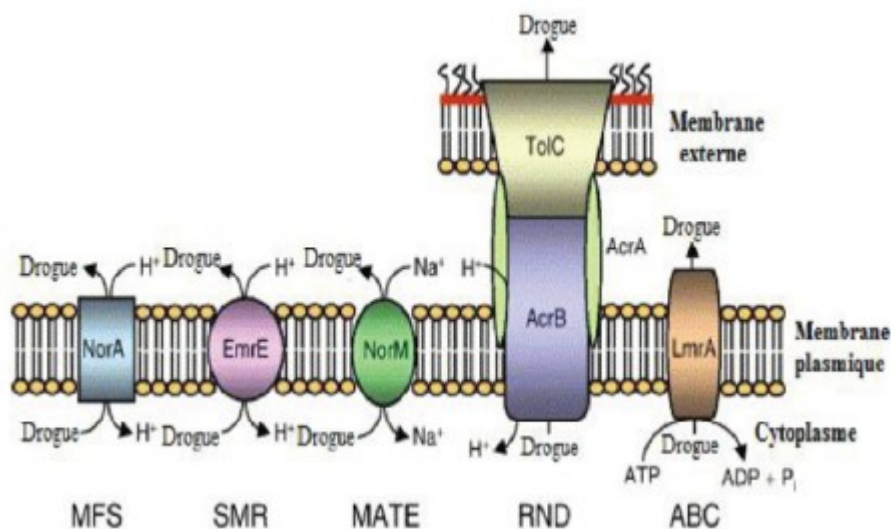


Figure 35: Les principales pompes bactériennes d'efflux et leurs fonctionnement. (Kumar et Schweizer ,2005).

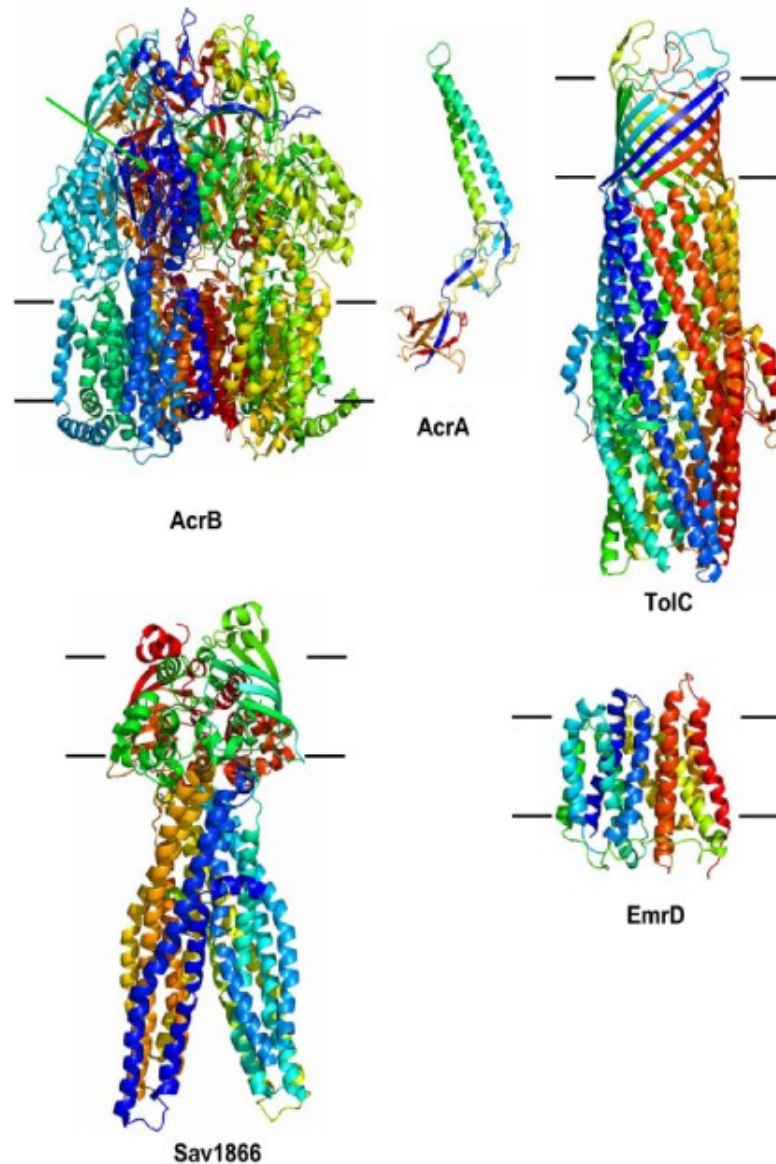


Figure 36: Structures tridimensionnelles de quelques pompes d'efflux bactériennes (Li et Nikaido ,2010).

II.4.4.2. La berbérine et les inhibiteurs des pompes à efflux

La berbérine est connu comme étant un substrat des pompes à efflux bactérien comme NorA. L'action de la berbérine se trouve considérablement diminuée à cause du système d'efflux bactérien qui maintient l'alcaloïde à des concentrations ne lui permettant pas d'exercer un effet antibactérien efficace. La potentialisation de l'activité antibactérienne de la berbérine peut se faire soit naturellement, soit artificiellement grâce à des inhibiteurs des pompes à efflux présents à l'état naturel dans la plante pour le premier cas ,ou couplés artificiellement à la berbérine par liaison chimique pour le deuxième cas (Lomovskata et Watkins,2001).

La potentialisation naturelle de l'activité antibactérienne de la berbérine chez les plantes *Berberis sp* se produit grâce la synthèse d'un composé chimique appelé la « 5'-MHC » (5'- méthoxyhydnocarpine » qui est une flavonoligane inhibitrice des pompes bactériennes d'efflux ainsi ,l'activité antibactérienne de la berbérine est augmentée d'un facteur de 16 en présence de la 5'-MHC contre *Staphylococcus aureus* .D'autres flavonoliganes comme la phéophorbide a extraite des plantes *Berberis sp*, ou la silybine isolée de *Silybum marianum* interagissent de façon similaire avec la berbérine (Guinoiseau , 2010).

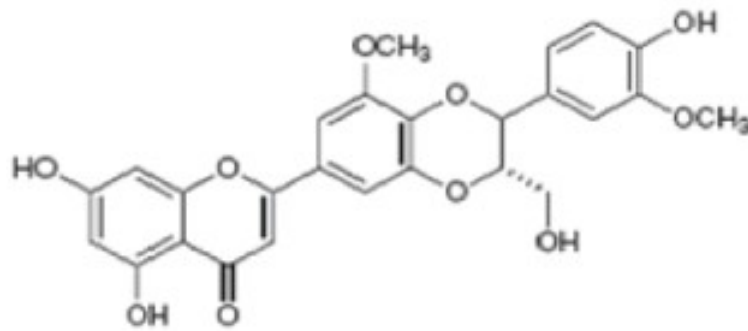


Figure 37: Structure chimique de la 5'-MHC (Stermitz et al., 2000)

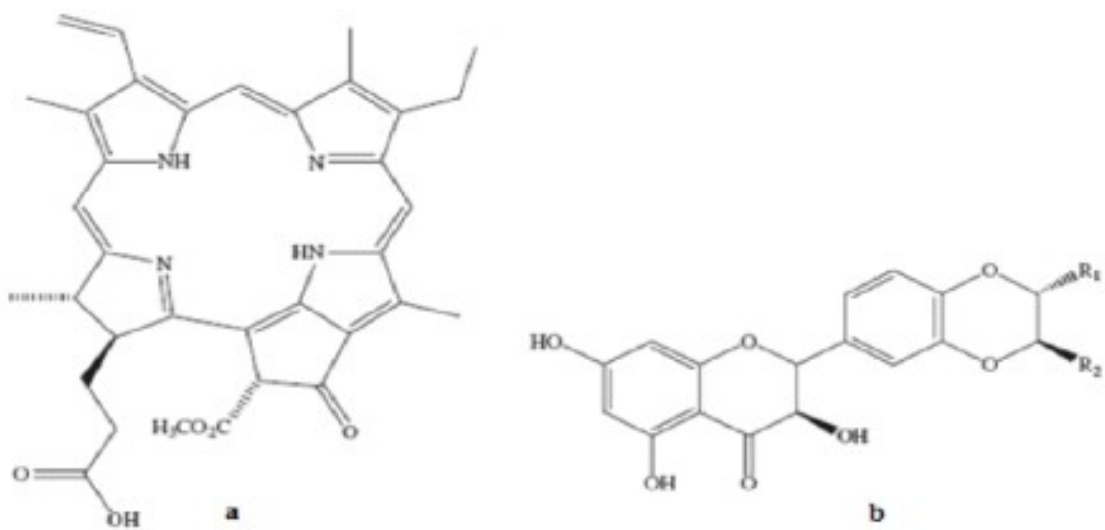


Figure 38: Structures chimiques de la phéophorbide a (a), et de la sylbine (b) (Stavri et al., 2007).

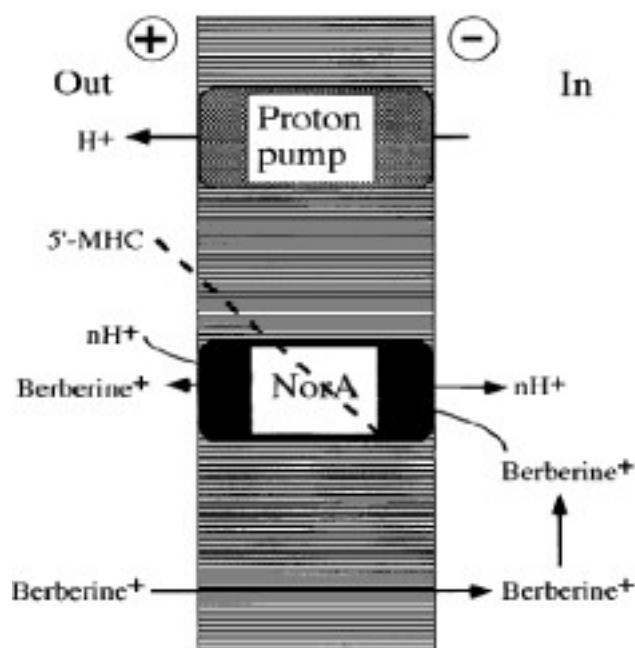


Figure 39: Action synergique de la berbérine avec la 5'-MHC (Stermitz et al., 2000).

L'hybride SS14 une molécule obtenue par voie de synthèse, illustre la potentialisation artificielle de l'activité antibactérienne de la berbérine. SS14 est obtenu par hybridation de la berbérine avec le composé INF55 (5-Nitro-2-Phenylindole), un inhibiteur des MDR (**Anthony et al., 2006**) .

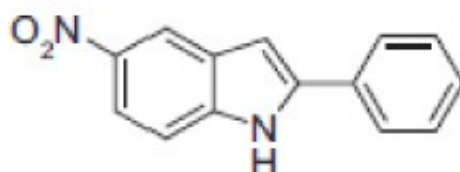


Figure 40: Structure chimique du 5-Nitro-2-Phenylindole (**Anthony et al ., 2006**)

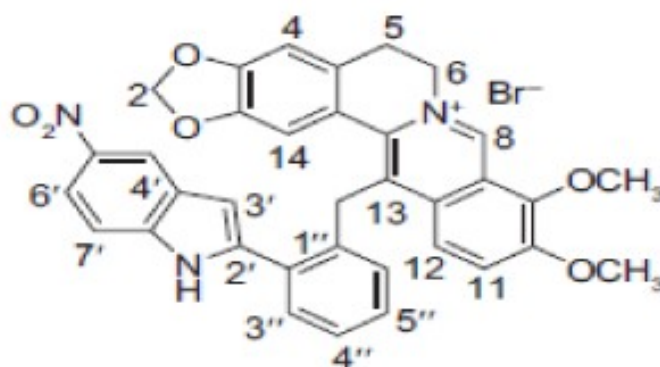


Figure 41: La structure chimique de l'hybride SS14 (**Anthony et al., 2006**)

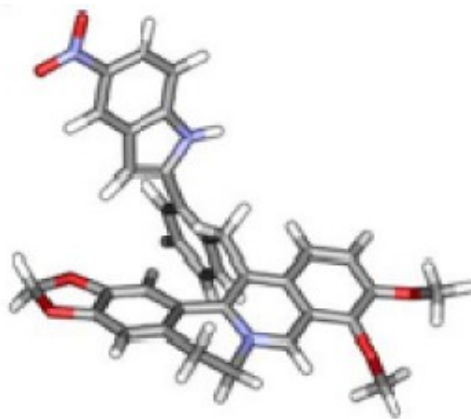


Figure 42: Structure tridimensionnelle de l'hybride SS14 (**Tomkiewicz et al., 2010**).

L'efficacité de l'hybride SS14 est démontrée contre *Staphylococcus aureus* avec une C.M.I de 9,4 μM contre 12,5 et 325 μM respectivement pour le mélange berbérine-INF55 et la berbérine seule (Tableau IV).

Tableau IV : Concentrations minimales inhibitrices de la berbérine seule et avec INF55 , et de l'hybride SS14 vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* (**Tomkiewicz et al., 2010**).

	Berbérine	Berbérine+ INF ₅₅	SS14
C.M.I (μM)	325	12.5	9.5

C.M.I : Concentration minimale inhibitrice