

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université de Jijel
Faculté des sciences
Département de biochimie et microbiologie

MB.04/04

Mémoire de fin d'étude

En Vue De L'obtention Du Diplôme
D'études Supérieures

Option : Microbiologie

Thème

Extraction et séparation des différentes
fractions flavonoïdiques de la plante
Ranunculus repens L.
et évaluation de l'activité antibactérienne
sur les staphylocoques.

Promoteur :

M^{me} Roula Sadjia

Président :

M^r Sebti . M

Examineur :

M^r BOUDJERDA. D

Présenté par :

- ❖ SABBA Ghaniyya
- ❖ LAHNADA Ouahiba
- ❖ BOUTELDJA Ibtiissam



Promotion 2003/2004

Remerciements

Nous tenons à formuler notre gratitude et notre profonde reconnaissance à l'égard de notre promoteur Madame ROULA Sadjia pour sa confiance, sa disponibilité et l'aide précieuse qu'il nous a prodiguée afin d'accomplir ce travail.

Nous tenons aussi à passer nos vifs remerciements à tous ceux qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire en particulier :

Monsieur BOUDJARDA Djamel pour son aide et ses précieux conseils.

Les membres des jurys :

Examineur : BOUDJARDA Djamel

Président : SEBTI Mohamed

Pour nous avoir honorés en acceptant de juger ce modeste travail.

Les techniciens du laboratoire de biologie d'université de Jijel.

En fin nous remercions tous les amis et toutes personnes ayant contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

Sommaire

-Introduction.

-Analyse bibliographique.

CHAPITRE I : *Ranunculus repens* L.

I. Les plantes médicinales.....	01
I.1. Famille : Renonculaceae.....	01
I.2. Genre : <i>Ranunculus</i>	01
I.3. Espèce : <i>Ranunculus repens</i> L.....	02
I.3.1. Systeématique de la plante.....	02
I.3.2. Les caractéristiques de la plante <i>Ranunculus repens</i> L.....	04
I.4. Les principes actifs élaborés par les plantes médicinales.....	05
I.4.1. Les alcaloïdes.....	05
I.4.2. Les flavonoïdes.....	05
a. Définition.....	05
b. Localisation.....	06
c. Structure des flavonoïdes.....	06
d. Propriétés générales des flavonoïdes.....	06
e. Rôle des flavonoïdes.....	07

CHAPITRE II : les staphylocoques

I. Les staphylocoques.....	08
I.1 Définition.....	08
I.2. Position taxonomique.....	08
I.3. Le genre <i>Staphylococcus</i>	08
I.3.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	09
I.3.2. <i>Staphylococcus coagulase négatif</i>	09
I.4. Caractères différentiels des principales espèces des staphylocoques ayant un rôle potentiellement pathogène.....	10
I.5. Les infections à staphylocoques	10
I.6. Sensibilité des staphylocoques aux antibiotiques.....	11

CHAPITRE III : les antibiotiques

I. Les antibiotiques.....	12
I.1.Définition.....	12
I.2.Sensibilité aux antibiotiques.....	12
I.3.L'antibiogramme.....	12
I.4.Mode d'action des antibiotiques et spectre d'activité.....	13
I.4.1.Mode d'action.....	13
I.4.2.Spectre d'activité.....	13

ANALYSE EXPERIMENTALE

I. Matériel.....	16
I.1.Matériel végétal.....	16
I.2.Autres matériels.....	16
II .Méthodes.....	17
II.1.Souches bactériennes.....	17
II.2.Isolement.....	17
II.3.Examen direct par la coloration de Gram.....	17
II.4.Identification.....	17
II.5.Extraction des flavonoides de la plante <i>Ranunculus repens L.</i>	18
II. 5.1.Séchage	18
II. 5.2.Broyage.....	18
II. 5.3.Extraction	18
a. Evaporation à sec	18
b. Reprise par l'eau distillée bouillante.....	18
c.Affrontement	18
d. Evaporation à sec.....	20
II.6.Préparation des dilutions des différentes fractions flavonoidiques de la Plante <i>Ranunculus repens L.</i>	22
II.7.Préparation de l'inoculum et ensemencement.....	24
II.8.Etude de l'activité des différentes fractions flavonoidiques antistaphylocoques.....	24
-Résultats et interprétation	25
-Discussion	28
-Conclusion.....	29

LES TABLEAUX

TABLEAU.1 : Les principes caractéristique de la plante <i>Ranunculus repens</i> L.....	04
TABLEAU.2 : Caractères différentiels des principales espèces de staphylocoque....	10
TABLEAU.3 : Les infections causés par des principales espèces de staphylocoques.....	10
TABLEAU.4 : Mode d'action et spectre d'activité des antibiotiques.....	14
TABLEAU.5 : Préparation des dilutions des différentes fractions flavonoidiques de la plante <i>Ranunculus repens</i> L.	22
TABLEAU.6 : L'activité antistaphylocoques coagulase positif et coagulase négatif vis-à-vis des aglycones.....	25
TABLEAU.7 : L'activité antistaphylocoques coagulase positif et coagulase négatif vis-à-vis des monoglycosides.....	26
TABLEAU.8 : L'activité antistaphylocoques coagulase positif et coagulase négatif vis-à-vis des di et triglycosides.....	26

LES FIGURES

Figure.1 : <i>Ranunculus repens</i> L.....	03
Figure.2 : Squelette de base des flavonoïdes.....	06
Figure.3 : Protocole d'extraction des flavonoïdes.....	21
Figure.4 : Les différents dilutions des aglycones	23
Figure.5 : Les différentes dilutions des monoglycosides.....	23
Figure.6 : Les différentes dilutions des di et triglycosides.....	23
Figure.7 : Méthode de diffusion en gélose (méthode des puits) testé sur une souche de staphylocoque.....	27

INTRODUCTION

Introduction.

La connaissance par l'homme de l'utilisation des plantes qu'il s'agisse des plantes alimentaires, toxiques ou médicinales est très ancienne.

Le chercheur utilise, en fait, toutes les approches possibles pour découvrir de nouvelles substances utiles. La découverte, dans l'extrait qui possède l'activité biologique d'une molécule responsable de cette activité, entraîne l'étude de son mécanisme d'action, de sa toxicité, de sa reproduction par synthèse chimique, ou de son obtention par culture de la plante, puis les études galiniques (mise en forme médicamenteuse) et cliniques peuvent conduire à la mise au point d'un médicament [9].

La recherche de nouveau agent antimicrobien est devenu une nécessité vu le phénomène de résistance des bactéries vis-à-vis des antibiotiques classiques, ce qui a orienté les recherches actuelles vers des substances bioactives d'origine végétales et qui aurai une activité anti-microbienne.

C'est dans ce cadre que se situe notre travail, porte sur la plante *Ranunculus repens L* qui est une plante des zones humides et très commune des régions de Beni Belaid dans la wilaya de Jijel.

Notre travail vise à extraire et séparer les différentes fractions flavonoïdiques de la plante *Ranunculus repens L*. et vérifier quelle est la fraction flavonoïdique qui agit exactement sur les staphylocoques.

**ANALYSE
BIBLIOGRAPHIQUE**

CHAPITRE I
RANUNCULUS REPENS L

I. Les plantes médicinales.

Depuis la nuit des temps, les hommes utilisent les plantes pour se soigner même si la pharmacopée actuelle, les occultent nombreuse sont ceux qui sont réduit par leurs aptitudes médicinales. Ainsi, depuis les années 80, la plante médicinale effectue un retour en force, s'appuyant des valeurs sûres testés de longues dates par nos ancêtres.

La transmission de ce savoir, par nos anciens, c'est interrompus avec la médecine "moderne", ainsi "les plantes qui guérissent" constitue un trésor d'information pour ceux et celles qui ont décidé d'aborder et leurs maux quotidiens différemment, en tournant le dos à l'arsenal chimique de la médecine actuelle [24].

Les médicaments d'origine végétale passent dans l'esprit de beaucoup de gens pour n'être pas toujours très efficaces mais être au moins bien tolérés parce que naturels et faisant partie de la médecine "douce" cette confiance en la nature n'est elle pas un peu aveugle et parfois dangereuse [21].

Parmi les plantes de la région de Jijel dites médicinales qui sont utilisées traditionnellement dans l'antibiothérapie, on peut cité les renoncules.

I.1- Famille : Renunculaceae .

Cette famille compte environ 40 genres et 1500 à 1800 espèces surtout localisées dans les régions tempérées et froides de l'hémisphère nord. Elles sont faiblement représentées sous les tropiques ou sur l'hémisphères sud, et qui montrent des formes très variées d'où certains difficultés pour définir, les caractères de cette famille , que l'on qualifie de "famille par enchaînement" c'est-à-dire quelle renferme, des espèces à caractères primitifs très différents, d'autres types beaucoup plus évolués mais rattachés entre eux par nombreuse série d'intermédiaire [2].

I.2- Genre : *Ranunculus* .

Au sein du genre *Ranunculus*, on distingue plusieurs des espèces parmi ces espèces trois espèces occupent une place privilèges.

- *Ranunculus acris*.
- *Ranunculus bulbosus*.
- *Ranunculus repens*.

I.3- Espèce *Ranunculus repens L* .

I.3.1- Systématique de la plante .

Les renoncules, appelées aussi "bouton d'or" appartient à la famille des Renonculacées qui comprend une quarantaine de genres et 1500 à 1800 espèces, dont le genre *Ranunculus* comprend environ 300 espèces [4].

La taxonomie de la plante *Ranunculus repens L* est la suivante [23] :

- Règne : Planta
- Sous règne : Tracheobionta
- Super division : Spermatophyta
- Division : Magnoliophyta
- Classe : Magnoliopsida
- Sous classe : Magnoliidae
- Ordre : Ranunculales
- Famille : Ranunculaceae
- Genre : *Ranunculus*
- Espèce : *Ranunculus Repens L*. (Figure 01)

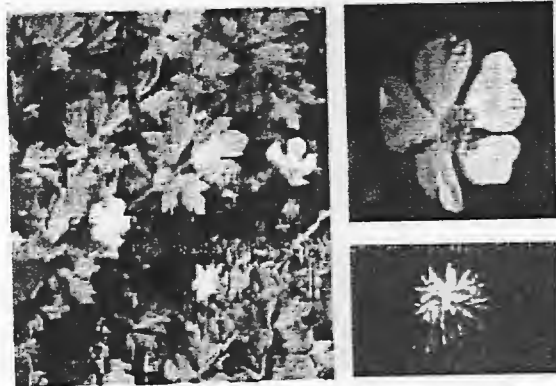


Figure 01 : *Ranunculus repens L*

I.3.2- Les caractéristiques de la plante *Ranunculus repens L* : [20] [22]

Les principales caractéristiques de la plante *Ranunculus repens L* sont représentés dans le tableau 01.

Tableau 01 : les principales caractéristiques de la plante *Ranunculus repens L*.

Nom scientifique	<i>Ranunculus repens L</i>
Nom français commun	Renoncule rampante, bouton d'or, pied de poule.
Famille	Ranunculaceae
Origine du nom	Le nom de genre signifie petite grenouille car certaines espèces vivent dans des endroits marécageux
Habitat	Très commune, se rencontre dans les lieux ombragés et suffisamment humides (prairies, jardins, chemins) jusqu'à 2300m d 'altitude.
Description	Plante vivace très variable, généralement duveteuse de taille basse à moyenne, les racines sont de longs stolons rampants, feuilles triangulaires à 3 lobes très dentés, celui du milieu étant pétiolé, fleurs jaune doré, de 2 à 3cm en grappes lâches, irrégulières avec sépales érigés, Akènes à bac incurve. La dénomination "bouton d'or" est en fait donnée à plusieurs variétés de renoncules dont la floraison est très similaire.
Cycle	Plante pérenne se multipliant par stolons floraison de mai à Juillet
médecine	Plante caustique qui peut provoquer des brûlures buccales si elle est mâchée.

I.4- Les principaux principes actifs élaborés par les plantes médicinales.

Le ou les principes actifs d'une plante médicinale sont les composants naturellement présents dans cette plante, ils lui confèrent son activité thérapeutique. Ces composants sont souvent en quantité extrêmement faible dans la plante. Ils représentent quelque pourcent à peine du poids total de celle-ci, mais ce sont eux qui en sont l'élément essentiel de nombreux médicaments renferment des principes actifs extraits des plantes. Les principes actifs sont mieux et totalement assimilés par l'organisme de tous les temps d'ailleurs, depuis que l'on utilise les plantes en médecine. On a traditionnellement procédé à l'extraction de leurs principes actifs selon des méthodes très diverses [17].

I.4.1- Les alcaloïdes .

Le nombre de métabolisme secondaire qui appartiennent à ce groupe est à peine concevable, on en connaît actuellement environ 3000 dans ces composés, le groupe contenant l'azote a en général été transformé en un hétérocycle à travers de diverses voies réactionnelles, à partir de molécule aliphatique d'un acide aminé[7].

Les alcaloïdes se trouvent dans les plantes sous la forme de sels d'acides organiques solubles dans l'eau. Les composés libres sont au contraire soluble. Que dans des solvants organiques lipophiles. Dans certains cas les alcaloïdes paraissent servir de moyens de dissuasion chimique contre les prédateurs, le goût assez amer caractéristique des nombreux alcaloïdes et leur toxicité vis-à-vis des homéothermes jouant un rôle certain [7] .

I.4.2- Les flavonoïdes .

a. Définition .

Le terme flavonoïde rassemble une très large gamme des composés naturels appartenant à la famille des polyphénols leur fonction principale semble être la coloration des plantes (au-delà de la chlorophylle, des caroténoïdes et des bétalaines), même si leur présence est par fois masquée par leur présence sous forme "leuco"(sphérique), ce qui explique leur intérêt commercial dans l'industrie alimentaire. Ce n'est que depuis quelques années que certaines propriétés pharmacologiques ont pu être mises en évidence, et que leur étude a pris un nouvel essor [20].

b. Localisation .

Les flavonoïdes sont retrouvées dans la totalité des produits végétaux et plus particulièrement dans les fruits, les légumes et les boissons.

Les flavonoïdes sont synthétisés au niveau de chloroplaste à partir des cinnamoyl-COA provenant du réticulum endoplasmiques, combinés sous forme d'hétérosides, ils quittent le chloroplaste et s'accumulent dans la vacuole.

Les flavonoïdes se trouvent surtout dans les vacuoles mais parfois aussi dans le cytoplasme et même dans les membranes des tissus lignifiés [10] .

c. Structure des flavonoïdes .

d'après la figure (02), Les flavonoïdes possèdent un squelette de base à quinze atomes de carbone constitué de deux cycles en C6 (A et B), reliés par une chaîne en C3. [19]

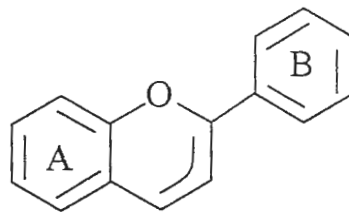


Figure 02 : Squelette de base des flavonoïdes. [17]

ã. Les propriétés générales des flavonoïdes.

- Contribue à la couleur des plantes.
- Rôle de phytoalexines (anti-champignons).
- Inhibiteurs d'enzymes
- Propriétés antibiotiques, antivirales ou encore antioestrogènes.
- Certains flavonoïdes sont toxiques pour les insectes et les poissons.
- Rôle d'antioxydants (coté circulation sanguine).
- Rôle d'antioxydants utilisés pour la conservation des huiles comestibles et du lard, utilisés aussi en cosmétologie dans les champings colorants et dans certains préparation de plantes médicinales (propriétés antiulcéreuses).

- Favorisent la relaxation vasculaire et empêchent l'agglutinement des plaquettes sanguines.
- Réduisent la coagulation du sang et le rendent plus fluide.
- Ils limitent l'oxydation des lipides sanguines et contribue à la lutte contre les plaques d'athérome.

e. Les rôles des flavonoïdes .

Les flavonoïdes sont dans toutes les parties des végétaux supérieures : racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, grains, bois,...etc, ils possèdent les rôles suivants :

- **Rôle biologique .**

D'après MER GHEM, 1985, on distingue 03 types :

- Rôle attractif : relation insectes fleurs.
- Rôle protecteur : photo protection vis-à-vis de l'u.v.
- Rôle adaptatif : jouer un rôle dans les chaînes d'oxydoréduction [11].

- **Rôle physiologique .**

Les flavonoïdes jouent un rôle dans : la croissance, la respiration, la morphogenèse, ainsi que les équilibres enzymatiques interviendraient à différents stades du développement.

- **Rôle pharmacologique .**

Surtout agir sur des maladies tel que la fragilité capillaire, les maladies veineuses. Autres actions sur le métabolisme ; ils sont des laxatifs et des purgatifs [11] .

CHAPITRE II
LES STAPHYLOCOQUES

I. Les staphylocoques.

I.1- Définition.

Les staphylocoques sont des cellules sphériques de 0.5 à 2.5 μm de diamètre qui se divisent sur plusieurs plans pour former des amas réguliers ou irréguliers en grappes de raisin, d'où leur nom (en grec staphylos). Ils sont immobiles et ne forment pas de spores [6].

Les staphylocoques sont des germes ubiquitaires on les trouve en effet dans l'air, les sols et les eaux. Ils appartiennent à la flore commensale de la peau et des muqueuses de l'homme et des animaux. [12].

Ils se développent facilement en aérobiose ou anaérobiose, sur la plupart des milieux usuels.

I.2- Position taxonomique.

La famille des micrococcaceae est composée de quatre genres de cocci à Gram positif en amas : *Micrococcus*, *staphylo-coccus*, *stomatococcus* et *planococcus* [12].

I.3- Le genre *staphylococcus* :

Au sein du genre *staphylococcus*, on distingue d'après la classification de KLOOS et Schleifer [4] plus de 20 espèces. Un certain nombre d'entre elles sont trouvées chez l'homme d'autres sont présentes chez les animaux ou dans les aliments (viandes, produits laitiers, ...). Parmi les espèces retrouvées chez l'homme, trois espèces occupent une place privilégiée : *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*.

- les autres, plus rarement impliquées en pathologie humaine, *staphylococcus hominis*, *staphylococcus haemolyticus*, *staphylococcus warneri*, *staphylococcus capitis*, *staphylococcus saccharolyticus*....etc.

Il est classique d'opposer *staphylococcus aureus* qui produit une coagulase et est souvent pathogène, aux autres staphylocoques, non producteurs de coagulase et plus rarement responsables d'infections. [1].

I.3.1- *Staphylococcus aureus*.

✦ Habitat .

Le *staphylococcus aureus* fait partie de la flore normale, il peut se trouver dans les fosses nasales, il peut être également isolé des selles [14].

✦ Morphologie .

Staphylococcus aureus est comme tous les staphylocoques, un coque à Gram positif d'un diamètre d'environ 1 µm apparaissant en amas (grappe de raisin) à l'examen microscopique.

Il est immobile, non sporulé et ne présente pas de capsule visible au microscope Optique [12].

✦ Enzyme et toxine .

- Bêta- lactamase.
- Staphylokinase.
- Staphylococcine.

I.3.2- *Staphylococcus coagulase- négatif* :

Les *staphylococcus coagulase-négatif* ont longtemps été considérés comme dépourvus de pouvoir pathogène et comme de simples contaminants de prélèvements défectueux. Aujourd'hui il est clair qu'au moins deux espèces *Staphylococcus epidermidis* et *staphylococcus saprophyticus*, sont des bactéries opportunistes potentiellement pathogène [4].

✦ Facteurs toxiques élaborés par *les staphylococcus coagulase- négatif* :

- Hémolysines de type delta.
- Par fois une coagulase liée.
- Fibronolysine.
- Leucocidine.
- DNase [4].

I.4- Caractères différentiels des principales espèces des staphylocoques ayant un rôle potentiellement pathogène. [1]

Ils sont représentés dans le tableau 02 :

Tableau 02 : caractères différentiels des principales espèces de staphylocoques

Caractère	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
- Coagulase	+	-	-
- DNase thermostable	+	-	-
- Résistance à la novobiocine (disque 5ug)	-	-	+ ^a
- Nitrate – réductase	+	+	-
- Phosphatase	+	+	-
- D manitol (acidification)	+	-	±

(a) : diamètre de la zone d'inhibition <16mm

I.5- Les infections à staphylocoques. [1]

Ces infections sont représentés dans le tableau 03 :

Tableau 03 : les infections causés par les principales espèces de staphylocoques .

<i>Staphylococcus aureus</i>	Staphylocoque coagulase- négatif	
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
<ul style="list-style-type: none"> - Les staphylococcies cutanée sous Cutanée et muqueuses. - Localisations viscérales. - Septicémies. - Toxi-infection alimentaire. - Entérocolites aiguës. - Syndromes de choc toxique. 	<ul style="list-style-type: none"> - Infections nosocomiales. - Infections des prothèses vasculaires ou articulaires des valves cardiaques. - L'endophtalmie. - L'endocardite subaiguë chez les drogués. - Maladie opportuniste des immunodéprimés. 	<ul style="list-style-type: none"> - Infections urinaires basses (cystites) chez la jeune femme.

I.6- Sensibilité des staphylocoques aux antibiotiques.

Les staphylocoques ont été, au début de l'ère des antibiotiques considérés comme très sensibles à ces agents mais, l'apparition des souches résistantes à été très rapide [18].

Les staphylocoques sont en effet capable de résister à tous les antibiotiques, à l'exception de la vancomycine, certaines souches résistantes simultanément à plusieurs antibiotiques et sont responsables d'infection grave, voir mortelles en raison des difficultés thérapeutiques.

La résistance a pour origine une mutation chromosomique ou l'acquisition d'éléments génétiques étrangers, et le phénotype de résistance aux antibiotiques du staphylocoque responsable de l'infection et le site infecté sont pris en compte pour le choix des antibiotiques administrés.

L'antibiothérapie est le traitement électif des staphylococcies [18].

CHAPITRE III
LES ANTIBIOTIQUES

I. Les Antibiotiques.

I.1- Définition.

Initialement "toute substance chimique produite par des micro-organismes ayant le pouvoir d'inhiber et même de détruire les bactéries et autres micro-organismes en solution diluée "[13].

Les antibiotiques n'interfèrent pas dans les réactions de dégradation et de production d'énergie[5].

Les antibiotiques synthétiques sont obtenus soit à partir de dérivés artificiels soit en sécrétant des substances primitivement extraites de micro-organismes. Les antibiotiques semi-synthétiques sont obtenus en modifiant en laboratoire une substance produite par un micro-organisme.

Les antibiotiques sont efficaces contre les bactéries mais pas contre les virus [13].

I.2- Sensibilité aux antibiotiques.

Le large choix des antibiotiques aujourd'hui disponible, permet de traiter la plupart des infections bactériennes, ils connaissent cependant des échecs souvent dus à la résistance développée par certaines bactéries.

Certains antibiotiques ont un mode d'action :

- Anti- bactérienne a usage systématique.
- Anti- infectieux généraux a usage systématique.
- Anti- cancéreux.
- Anti- coagulants.
- Anti- conceptionnels.

Ces antibiotiques agissent à des niveaux particuliers pour détruire ou empêcher la multiplication des germes [13].

La sensibilité d'un germe est déterminée par la méthode de l'antibiogramme [5].

I.3- L'antibiogramme.

C'est une technique de laboratoire qui détermine la sensibilité d'une bactérie à l'égard des antibiotiques [13].

Lorsque une bactérie pathogène est identifiée dans un prélèvement bactériologique, un antibiogramme peut être réalisé. Celui-ci consiste à tester un panel d'antibiotique vis-à-vis de la

bactérie isolée, il permettra ainsi définir pour chaque antibiotique, si la bactérie est sensible (dans ce cas l'antibiotique est efficace sur le germe).

intermédiaire (l'antibiotique n'est efficace que dans certaines conditions à fortes doses), ou résistance (l'antibiotique est inefficace).

L'antibiogramme apporte une aide très importante au médecin pour choisir l'antibiotique à prescrire, il peut ainsi être amené à changer de traitement, vu ces résultats [16].

I.4- Mode d'action des antibiotiques et spectre d'activité.

L'antibiotique est soit bactériostatique et/ou bactéricide. On définit plusieurs familles d'antibiotiques en fonction de leur nature chimique, de leur mécanisme d'action et de l'étendue de leur spectre. [13].(tableau 04)

I.4.1- Mode d'action.

Ils agissent à un niveau précis des structures bactériennes.

I.4.2- Spectre d'activité.

Pour tout nouvel antibiotique on étudie et définit son " Spectre d'activité " c'est à dire la liste des espèces sur lesquelles il agit ; certains agissent sur de nombreuses espèces, ils ont un spectre "large" d'autres ont un spectre beaucoup plus limité voire très étroits [5].

Tableau 04 : mode d'action et spectre d'activité des antibiotiques. [6]

Antibiotique	Mode d'action	Spectre d'activité antibactérien coques Gram +
Béta- lactamines	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibition de la formation des constituants de la paroi (peptidoglycane) : - Fixation sur les PLP et inhibition enzymatique (de type compétitif) par analogie structurale entre le cycle beta-lactame et le motif (D-ala-D-ala) du disaccharide penta-péptide. 	Oui ^a
Glycopéptides	<ul style="list-style-type: none"> - Fixation sur le motif (D-ala-D-ala) du disaccharide penta peptide empêchant par encombrement stérique, l'action : (1) des transpeptidases : (2) des transglycosylases. 	Oui
Fosfomycine	<ul style="list-style-type: none"> - Inhibition de la pyranyl transférase cytoplasmique qui convertit la N-acetyl-glucosamine en acide N-acety-muramique. 	Oui
Aminosides	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibition de la synthèse protéique : - Fixation sur la sous unité 30S et/ou 50S du ribosome et inhibition de la translocation du peptide au cours de formation. 	Oui ^b
Tetracycline	<ul style="list-style-type: none"> - Fixation sur la sous unité 30S du ribosome et inhibition de la fixation de l'aminoacyl-ARNt sur le site ribosomal spécifique. 	Oui
Phenicolés	<ul style="list-style-type: none"> - Fixation sur la sous unité 50S du ribosome et inhibition de la formation de la liaison peptidique. 	Oui
Polymyxines	<ul style="list-style-type: none"> Altération des membranes : - Désorganisations membranaires par fixation sur les phospholipides et le LPS. 	Non
Quinolones	<ul style="list-style-type: none"> Inhibition des acides nucléiques : - Inhibition de la sous-unité A de ADNgyrase, enzyme intervenant dans le surenroulement de l'AND. 	Oui ^c
Triméthoprimé et sulfamides	<ul style="list-style-type: none"> - Inhibition de la synthèse des folates (précurseurs des bases puriques) par compétition avec la dihydrofolate-reductase (triméthoprimé) et la dihydroptéroate-synthétase (sulfamide). 	Oui
Rifamycines	<ul style="list-style-type: none"> - Inhibition de la transmission de l'ADN par fixation sur l'ARN polymérase ADN-dépendante. 	Oui
Nitro- imidazoles	<ul style="list-style-type: none"> - Fixation sur l'ADN et fragmentation. 	Oui ^d

- a : Spectre d'activité anti-microbienne différent selon les représentations de cette famille.
- b : Sauf les bactéries anaérobies strictes et les streptocoques.
- c : Sauf les quinolones de 1^{ère} génération (acide nalidixique).
- d : Uniquement les bactéries anaérobies strictes.

**PARTIE
EXPERIMENTALE**

I. Matériel.**I.1- Matériel végétal.**

La cueillette de la plante *Ranunculus repens L.*, a été fait à partir de la région de BENI BELAID –Jijel au mois de Mai.

I.2- Autres matériels.

- Boîtes de pétri.
- Anses de platine.
- Becher.
- Entonnoir.
- Flacons stériles.
- Filtres.
- Tamis.
- Bec benzène.
- Tubes à essai stériles.

✦ Appareils utilisés.

- Etuve.
- Broyeur.
- Rota -vapeur.
- Balance électronique.
- L'ampoule à décantation

✦ Milieux utilisés.

- Gélose Chapman.
- Gélose Mueller- Hinton.
- Milieu cœur cervelle (BHIB).
- Milieu de conservation.

✦ Solvants et réactifs.

- Ethanol.
- Eau distillée.
- Ether de pétrole.
- L'hexane.
- Ether diéthylique.

- Acétate d'éthyle.
- n. butanol.
- Plasma de lapin.

II. Méthodes.

Notre travail vise à extraire et séparer les différentes fractions flavonoïdiques de la plante *Ranunculus repens L.* et l'étude de leurs effets antistaphylocoques.

II.1- Souches bactériennes.

Les souches bactériennes de staphylocoques ont été isolées de différents produits pathologiques (prélèvement vaginale, spermes, crachat, pus,...) au niveau du laboratoire d'hygiène de la wilaya de Jijel et le laboratoire de microbiologie de l'université de Jijel. On a obtenu après identification 21 souches de staphylocoques : 07 souches coagulase positif, 14 souches coagulase négatif.

II.2- Isolement.

Les souches sont isolées sur gélose Chapman.

Les staphylocoques coagulase négatif: sont des colonies non pigmentées, brillantes, crémeuses, blanches et de 1 à 2mm.

- les staphylocoques coagulase positif: des colonies pigmentées dorés.

II.3- Examen direct par la coloration de Gram.

Après la coloration de Gram, les staphylocoques apparaissent comme des cocci à Gram positif, de 0,5 à 2,5 μm de diamètre disposés en amas, en diplocoques, en courtes chaînettes voire en grappe de raisin.

II.4- Identification.

Nous avons identifié les staphylocoques coagulase négatif et les staphylocoques coagulase positif, nous basons sur le test de la coagulase.

✦ Le test de coagulase.

On ensemence un inoculum dans 2,5 ml de milieu (cœur cerveau (BHIB)) à partir d'une culture jeune, on laisse 24h à 37°C, puis addition de 2,5 ml de plasma de lapin. L'incubation se fait à 37°C, et l'observation après 4h, puis après 8h. L'apparition d'un coagulum traduit la présence de la coagulase.

II.5- Extraction des flavonoïdes de la plante *Ranunculus repens L.*

L'extraction se fait au niveau du laboratoire de l'institut de biologie selon le protocole expérimental (Figure03).

5.1- Séchage.

Après la cueillette de la plante et le lavage par l'eau distillée, on la sèche à l'air libre pendant 3 jours, puis dans l'étuve à 45 °C pendant 2 jours.

5.2- Broyage.

Nous avons fait le broyage des parties les plus jeunes de la plante à l'aide d'un broyeur de 8000 tours/min pendant 25 secondes jusqu'à obtention d'une poudre très fine.

5.3- Extraction.

Nous avons pris 31g du matériel végétal avec 500 ml de l'éthanol dilué à 75% (soit 350ml d'éthanol + 150ml d'eau distillée) dans une fiole, et on laisse macérer pendant 3jours, puis on filtre le mélange à l'aide du papier filtre.

a. Evaporation à sec.

Afin de séparer l'extrait sec de la phase éthanolique, nous avons utilisé le rota-vapeur à température de 79°C à 02 tours/min jusqu'à obtention d'un extrait sec de substances organiques et notamment les flavonoïdes.

b. Reprise par l'eau distillée bouillante.

Nous avons : 10g de matière végétale → 100 ml d'eau distillée

31g de matière végétale → x ml d'eau distillée

Le volume d'eau distillée qu'on doit ajouter est de 310 ml.

On laisse macérer pendant 24 heures, puis on filtre à fin d'éliminer les impuretés.

Le volume final de la phase aqueuse obtenue est de 300 ml.

c. Affrontement.

L'affrontement de la phase aqueuse se fait par 05 solutions différentes :

- Ether de pétrole pour éliminer la chlorophylle.
- Hexane pour éliminer les lipides.
- Ether diéthylique : solvant préférentiel des aglycones flavonoïdiques.
- Acétate d'éthyle : solvant préférentiel des monoglycosides.
- n-butanol : solvant préférentiel des di et triglycosides.

✦ Affrontement par l'éther de pétrole.

Nous avons ajouté 100 ml d'éther de pétrole à la phase aqueuse. Après agitation énergétique et repos de 10 min, on met le mélange dans une ampoule à décantation. Deux phases sont obtenues:

- Une phase éther de pétrole en haut contenant la chlorophylle.
- Une phase aqueuse en bas.

✦ Affrontement par l'hexane.

Sur la phase obtenue après affrontement par l'éther de pétrole, nous avons répété les mêmes opérations mais avec un autre solvant qui est l'hexane, deux phases sont obtenues:

- La phase hexane contenant les lipides
- La phase aqueuse en bas.

✦ Affrontement par l'éther diéthylique.

Nous avons répété les mêmes opérations mais avec un autre solvant qui est l'éther diéthylique. Deux phases sont obtenues :

- La phase éther diéthylique contenant les aglycones en haut.
- La phase aqueuse en bas.

Pour extraire le maximum possible des aglycones, la phase aqueuse obtenue subit un autre affrontement par l'éther diéthyle.

✦ Affrontement par l'acétate d'éthyle.

Même technique que précédemment mais en utilisant un autre solvant qui est l'acétate d'éthyle.

De même deux phases sont obtenues :

- Une phase acétate d'éthyle contenant les monoglycosides en haut.
- Une phase aqueuse en bas.

✦ Affrontement par n-butanol.

Même technique que avant, mais le solvant utilisé est le n-butanol. De même, deux phases sont obtenues :

- Une phase n-butanol contenant les di et triglycosides en haut.
- Une phase aqueuse en bas.

d. Evaporation à sec.

Les différentes phases, éther diéthylique, acétate diéthyl, n-butanol ont subit une évaporation à sec dans le rota-vapeur. Pour le n-butanol, l'évaporation s'effectue dans l'étuve à 50°C.

Nous avons obtenu l'extrait brut de chaque phase. A l'aide d'une balance électronique sensible, la masse des extraits bruts obtenue est de 155g du matériel végétal broyé.

- Après l'évaporation à sec, on a obtenu:
 - $0,66 \times 10^3$ mg des aglycones et pour la récupération, on ajoute 44ml d'eau distillée stérile bouillante. Donc la concentration de la solution est de 15 mg/ml.
 - $1,28 \times 10^3$ mg des monoglycosides et pour la récupération, on ajoute 85ml d'eau distillée stérile bouillante. Donc la concentration de la solution est de 15mg/ml.
 - $0,40 \times 10^3$ mg des di et triglycosides et pour la récupération on ajoute 26 ml d'eau distillée stérile bouillante. La concentration de la solution est de 15mg/ml.
- La figure 03 montre les différentes étapes d'extraction des flavonoïdes.

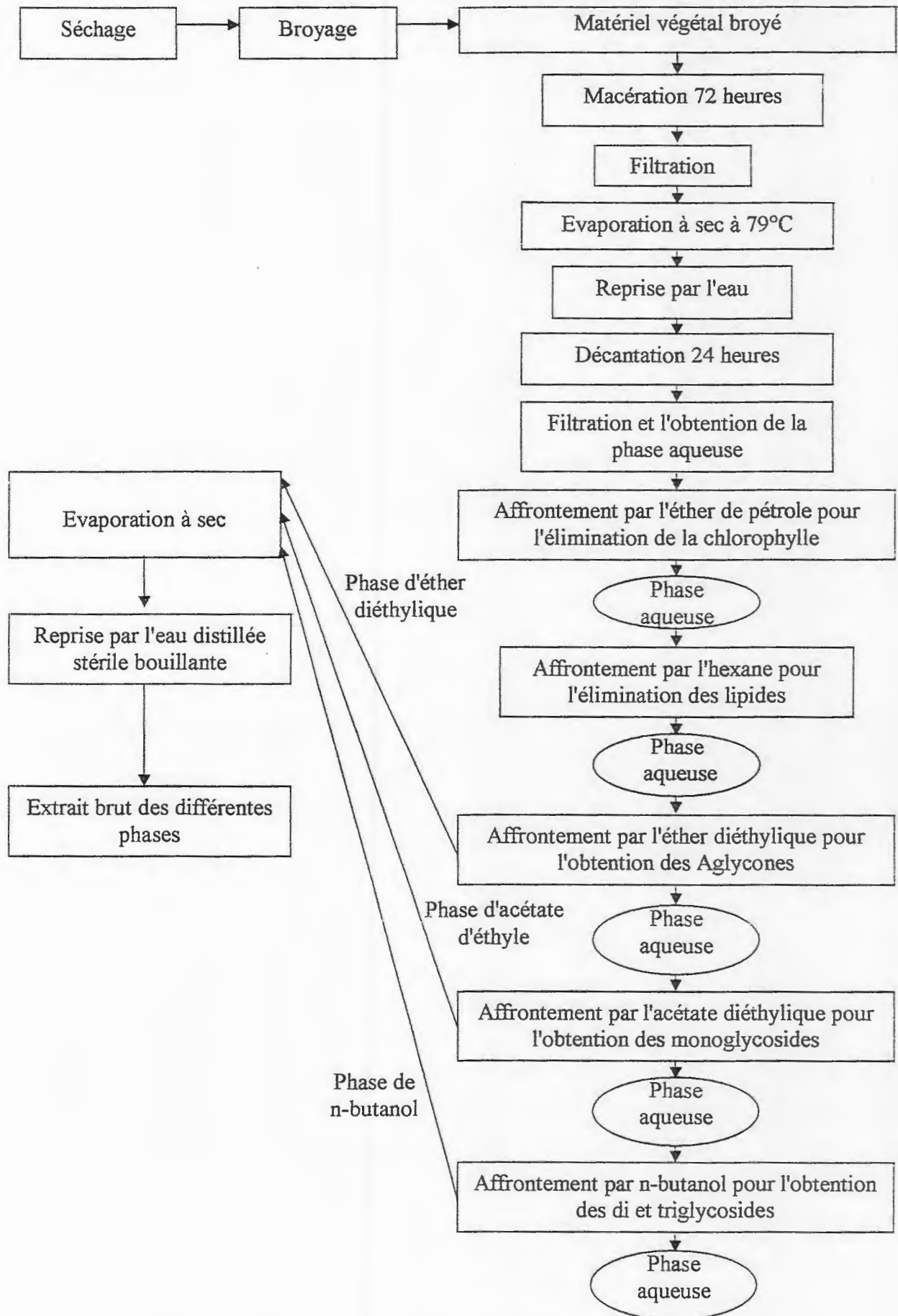


Figure 03 : protocole d'extraction des flavonoïdes [3].

II.6- Préparation des dilutions des différentes fractions flavonoïdiques de la plante *Ranunculus repens L.*

Les volumes de chaque fraction flavonoïdiques et l'eau distillée stérile utilisée pour la préparation des dilutions sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 05 : Préparation des dilutions des différentes fractions flavonoïdiques de la plante *Ranunculus repens L.*

Dilution \ Volume en μl	Volume de fraction flavonoïdique	Volume de l'eau distillée stérile	Volume totale
1/01	4000,00	0000,00	4000
1/02	2000,00	2000,00	4000
1/05	0800,00	3200,00	4000
1/10	0400,00	3600,00	4000
1/15	0266,66	3733,33	4000
1/20	0200,00	3800,00	4000

On obtient trois séries de dilutions pour chaque fraction (aglycones, monoglycosides et di et triglycosides), figures (04), (05) et (06).





Figure 01 : Les différentes dilutions des aglycones.

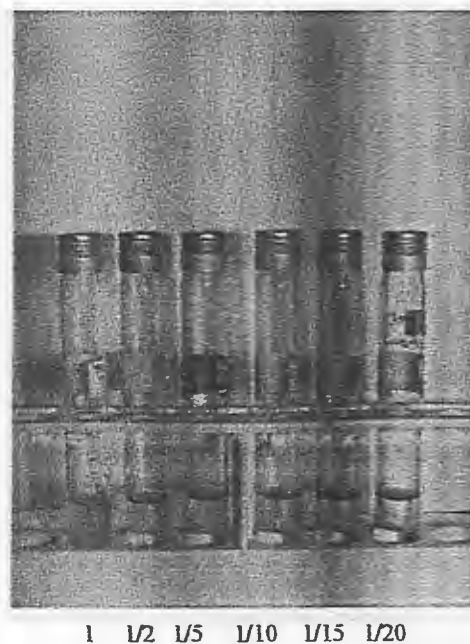


Figure 02 : Les différentes dilutions des monoglycosides..

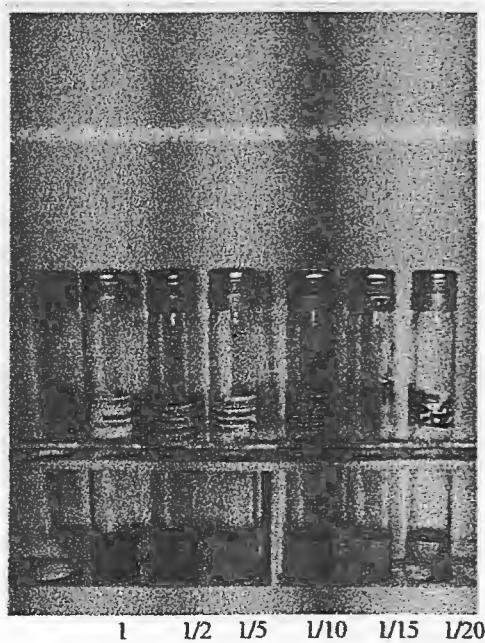


Figure 03 : Les différentes dilutions des di et triglycosides.

II.7-Préparation de l'inoculum et ensemencement.

- La préparation de l'inoculum se fait à partir d'une culture jeune de 18h sur bouillon nutritif, on prélève une ose de la suspension bactérienne à l'aide d'une anse de platine stérile.
- Déposer l'ose de la suspension bactérienne dans 10 ml d'eau physiologique stérile.
- Homogénéiser la solution bactérienne pour l'obtention d'une suspension.
- L'inoculum doit être utilisé dans les 15 minutes qui suivent la préparation.
- Faire fondre la gélose Mueller-Hinton au bain marie.
- Mettre la gélose dans les boîtes de pétries jusqu'à l'obtention d'une épaisseur de 4 mm
- Laisser refroidir puis on ensemence par l'inondation à partir de l'inoculum bactérienne préparé précédemment.
- Aspirer le liquide en excès à l'aide d'une pipette pasteur, puis le mettre sécher 15 minutes ou plus à 37°C.
- Toutes les opérations se déroulent dans la zone stérile près de bec benzène.

II.8- Étude de l'activité des différentes fractions flavonoïdiques

antistaphylocoques.

Pour montrer quel est ou quelles sont les fractions qui a ou ont un effet antistaphylocoques. On a utilisé la méthode de diffusion en gélose.

✦ Méthode de diffusion en gélose (méthode des puits) :

• Préparation des puits .

- Réaliser 06 puits dans chaque boîte ensemencée et séchée.
- Mettre une goutte de gélose de conservation dans chaque puit et on laisse refroidir.
- Distribuer dans chaque puit 50 µl de chaque dilution des différentes fractions flavonoïdiques de façon à réaliser une gamme de concentration croissante.

- **Incubation** : Les boîtes sont incubées 18 heures à 37°C.

➤ **Résultats et interprétations.**

Notre étude comporte:

- L'extraction des 03 fractions flavonoïdiques (Aglycones, monoglycosides et di et triglycosides) de la plante *Ranunculus repens L.*
- L'évaluation de l'activité anti-staphylocoques coagulase positif et coagulase négatif des différentes fractions flavonoïdiques de la plante *Ranunculus repens L* par la méthode des puits.

Nous avons utilisé 07 souches coagulase positif et 14 souches coagulase négatif.

Les résultats obtenus à l'issu du test de diffusion en gélose (méthode des puits) de différentes fractions flavonoïdes de la plante *Ranunculus repens L.* sur les staphylocoques coagulase positif et coagulase négatif sont représentés dans les tableaux suivantes :

Tableau 06: l'activité anti-staphylocoques coagulase positif et coagulase négatif vis-à-vis des aglycones .

Les dilutions des aglycones	1/1	1/2	1/5	1/10	1/15	1/20
les souches bactériennes						
Les souches coagulase positif	-	-	-	-	-	-
Les souches coagulase négatif	-	-	-	-	-	-

On a remarqué que les aglycones ne montrent aucune activité envers les staphylocoques coagulase positif et coagulase négatif.

Tableau 07 : l'activité antistaphylocoques coagulase positif et coagulase négatif vis-à-vis des monoglycosides.

les souches bactériennes	Les dilutions des monoglycosides	1/1	1/2	1/5	1/10	1/15	1/20
	Les souches coagulase positif		-	-	-	-	-
Les souches coagulase négatif		-	-	-	-	-	-

On a remarqué que les monoglycosides ne montrent aucune activité vis-à-vis les staphylocoques coagulase positif et coagulase négatif.

Tableau 08: l'activité antistaphylocoques coagulase positif et coagulase négatif vis-à-vis des di et triglycosides

les souches bactériennes	Les dilutions des di et triglycosides	1/1	1/2	1/5	1/10	1/15	1/20
	Les souches coagulase positif		-	-	-	-	-
Les souches coagulase négatif		-	-	-	-	-	-

On a remarqué que les di et triglycosides ne montrent aucune activité vis-à-vis les staphylocoques coagulase positif et coagulase négatif.

❖ La figure 07 représente les résultats du test de diffusion en gélose (méthode des puits).

DISCUSSION

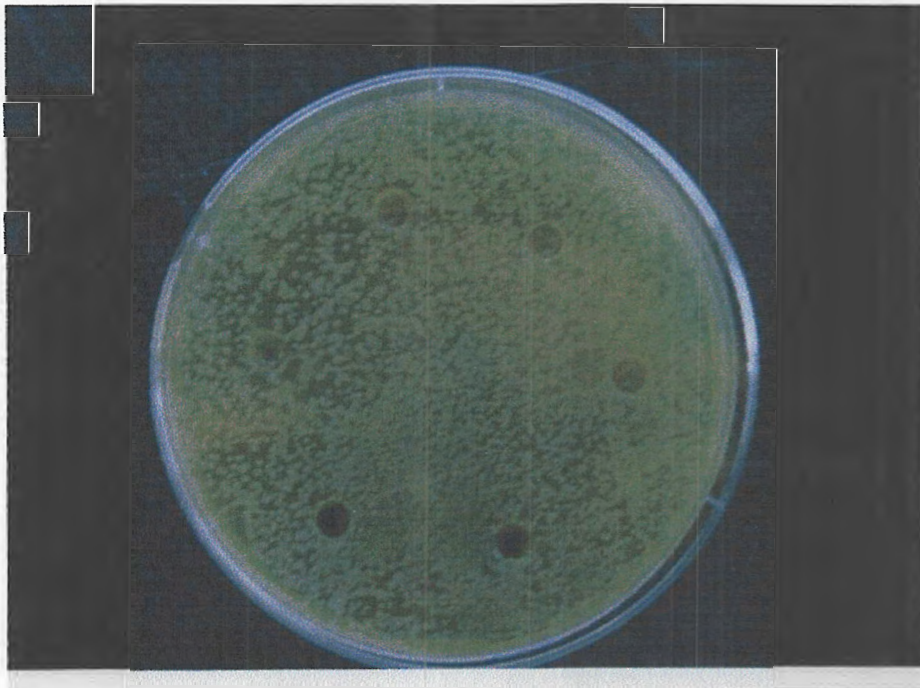


Figure 7 : méthode de diffusion en gélose (méthode de puis) testé sur une souche de staphylocoques.

On a remarqué une pousse bactérienne autour des puis .les flavonoides de la plante *Ranunculus repens L* .(aglycones ,monoglycosides ,di et triglycosides)n'ont pas un effet antistaphylocoques.

Discussion.

Parmi les plantes médicinales de la wilaya de Jijel, *Ranunculus repens L.*, sur laquelle le travail rapporte ici. Ce dernier consiste à extraire, séparer et tester trois fractions flavonoïdiques (aglycones, monoglycosides, di et triglycosides) de la plante bien desséchée sur les staphylocoques, in-vitro, pour déterminer une éventuelle activité antibactérienne.

On a étudié l'effet des fractions : aglycones, monoglycosides, di et triglycosides envers les staphylocoques avec des différents dilutions (1, 1/2, 1/5, 1/10, 1/15, 1/20) par la méthode de diffusion en gélose. Ces fractions n'ont montré aucune activité antistaphylocoques.

Se référant à la bibliographie, nous proposons d'utiliser les techniques chromatographiques habituelles pour obtenir un bon contrôle de pureté, et des meilleurs résultats[3].

D'autre part, la partie bibliographique rapporte que les renoncules contiennent une hétéroside de lactone, qui par hydrolyse libère de la protoanimonine extrêmement vésicante. Une fois séchée la plante est moins toxique.

La protoanimonine a effectivement une activité biologique, c'est une "Anti" mais, plutôt qu'un antitumoral, c'est un antibactérien [8]. Ce qui pourrait être une preuve qui vérifie l'action efficace de l'extrait de la plante fraîche contre les bactéries.

Il est donc clair qu'il pourrait y avoir une activité plus significative lorsque l'extrait est obtenu à partir de la plante fraîche.

CONCLUSION

Conclusion.

Des milliers de plantes, sont des sources encore peu exploitées, de substances plus actives. Il s'agit d'un clavier infini dont dispose le chercheur pour la découverte de nouveaux médicaments.

Nous avons obtenu trois fractions flavonoïdiques aglycones, monoglycosides, di et triglycosides à partir de la plante *Ranunculus repens L.*, bien desséchée. D'après les résultats obtenus avec la méthode de diffusion en gélose, on a constaté que les trois fractions n'ont montré aucune activité envers les souches de staphylocoques isolés de différents produits pathologique (sperme, prélèvement vaginaux, urines, pus).

Vu les résultats de notre étude, nous proposons d'étudier l'extrait totale de la plante fraîche, et pour montrer quel est ou quelles sont leurs fractions qui ont un effet antistaphylocoques ou antibactériens, on propose de séparer, purifier et tester chaque fraction fondé sur les techniques de la chromatographie habituelle.

Références Bibliographiques.

Livres.

- [1]: **Avril. J. L , DABERNAT.H, DENIS.F, MONTEIL.H.**, Bactériologie clinique, 2^{ème} édition 1992 pages :10, 12,13,22, 24, 25.
- [2]: **BESANGER.L, BEAU Quesne, PINKAS.M, TORK.M et TRATIN.F.**, Plantes médicinales des régions tempérés. 2^{ème} édition. 1990.
- [3]: **BRUNETON.J.**, Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales. 1993 2^{ème} édition.
- [4]: **BUNETON.J.**, Plantes toxiques : végétaux dangereux pour l'homme et l'animal 1997 page :395.
- [5]: **DUVAL.J, SOVY.C-G.**, Antibiothérapie. Page : VII.
- [6]: **LEDERE.H, GAILLARD.J, SIMONET.M.**, Microbiologie générale la bactérie et le monde bactérienne 1994. pages : 438, 440, 506.
- [7]: **GERHARD- Richter.**, Métabolisme des végétaux physiologie et biochimie. pages : 333, 337, 338, 436.
- [8]: **LASZLO Pierre.**, le savoir des plantes décembre 1999, France, page : 44.
- [9]: **SEVENET Thierry.**, plantes, molécules et médicaments. Octobre 1994 pages : 24, 25.

Mémoires.

- [10]: « effet antibactérien de l'association antibiotique flavonoïdes ». mémoire de fin d'étude université de Constantine 2002 pages : 15, 16.
- [11]: « l'extraction, purification et identification des flavonoïdes à partir de *Ranunculus repens* L », mémoire de fin d'étude université de Jijel. 2002

Sites web.

- [12]: <http://www.anne.decoستر.free.fr/staph/staph.htm>.
- [13]: <http://www.antibiotiques.info.org/anti01a.asp>
- [14]: <http://www.chups.jussien.fr/polys/bactério/bactério/poly.chp.3html>.
- [15]: <http://www.chu.vouen.fr/ssf/prod/antibiotique.htm>.
- [16]: <http://www.doctisima.fr/html/sante analyses/ 50-738 gram.htm>
- [17]: <http://www.eutraco.com/sante/les plantes/princiactifs.htm>
- [18]: <http://www.galopin.fr.net/infect/staphylo.htm>
- [19]: <http://www.médecines aturelles.com/pages/sante/phytotherapie/composant.php>
- [20]: <http://www.membres.lycos.fr/mourad/flavonoïdes.html>
- [21]: <http://www.pharmacorama.com//ezine/plantes.php>
- [22]: <http://www.Plantes.comestibles.com/plantes-comestibles.php ?aage.fiches.php ? ID bouton d'or>.
- [23]: <http://www.plantes.usda.gov/cgi-bin/plant profi/cgi ? symbol=PAR>
- [24]: <http://www.univers-nature.com/livre/plante-médicinale.html>

ANNEXES

Annexel.

Composition des milieux utilisés :

1) Milieu Chapman.

- Extrait de viande	1g/l
- Chlorure de sodium	75g/L
- Peptone	10g/l
-Gélose	15g/l
-Mannitol	10g/l
-Rouge de phénol	0,025g/l

2) Bouillon nutritifs.

-Extrait de viande	5g
-Peptone pancréatique	10g
-Chlorure de sodium	5g

3) Milieu Muller-Hinton.

-Infusion de viande de bœuf	300g
-Hydrolysate de caséine	75,5g
-Amidon	1,5g
-Gélose	10g

Annexe2.

Coloration de Gram.

La coloration de Gram permet de distinguer 2 principaux groupes de bactéries : Gram positif et Gram négatif

Technique de coloration.

- Placer la lame horizontalement sur un porte- lame après fixation du frottis par l'alcool.
- Ajouter le violet de gentiane pendant une minute, rincer à l'eau.
- Ajouter du lugol pendant une minute, rincer à l'eau.
- Ajouter de l'alcool pendant 30 secondes, rincer à l'eau.
- Ajouter de la fushine pendant une minute, rincer à l'eau.
- Sécher la lame et faire la lecture au microscope (objectif x 100) avec l'huile de cèdre.

Présenté par : **SABBA Ghaniyya**
BOUTELDJA Ibtissam
LAHNADA Ouahiba

Date de soutenance : 29/09/2004

Thème :

Extraction et séparation des différentes fractions flavonoïdiques de la plante *Ranunculus repens L* et évaluation de l'activité antibactérienne sur les staphylocoques

Résumé :

La connaissance par l'homme de l'utilisation des plantes qu'ils s'agissent des plantes alimentaires, toxiques ou médicinales est très ancienne.

L'action des différentes plantes médicinales est due à certains composants élaborés par la plante, sont les principes actifs.

L'objectif de notre recherche consiste à mettre en évidence l'existence d'une éventuelle activité antistaphylocoques des fractions aglycones, monoglycosides, di et triglycosides à partir de l'extrait de la plante *Ranunculus repens L*. bien desséchée, la plante très utilisée dans la région de Jijel.

L'évaluation de cette activité antistaphylocoques est réalisée par le test de diffusion en gélose.

Nous avons conclu, à la fin de notre étude que les fractions (aglycones, monoglycosides, di et triglycosides) n'ont pas aucune activité antistaphylocoques.

Summary :

The knowledge by the man of the plant use that they were about the food, poisonous or medicinal plants is very old

The action of the different medicinal plants is owed to certain components elaborated by the plant, are the active principles.

The objective of our research consists in putting in evidence the existence of a possible activity antistaphylocoques of fractions aglycones, monoglycosides, di and triglycosides from the excerpt of the plant *Ranunculus repens L*. very dry, the plant very used in the region of Jijel.

The assessment of this activity antistaphylocoques is achieved by the test of diffusion in gélose.

We concluded, at the end of our survey that fractions (aglycones, monoglycosides, di and triglycosides) don't have any activity antistaphylocoques.

ملخص:

إن معرفة الإنسان لاستعمال النباتات بصورة غذائية، سمية أو طبية كان قديم جداً، وتعود التـأثيرات المختلفة للنباتات الطبية إلى مركبات تنتجها هذه النباتات، تعرف بالمركبات النشطة.

يرتكز موضوع دراستنا على توضيح تأثير المركبات النشطة:

الموجودة بولاية جيجل على بكتيريا *staphylocoques* و *monoglycosides*, *di et triglycosides* من نبتة *Ranunculus repens L* الجافة.

لتقدير تأثير هذه المركبات استعمالنا طريقة الانتشار في الوسط الصلب، التي بينت في النهاية أن المركبات هذه

ليس لها تأثير على بكتيريا *staphylocoques*.

Mots clés : Plantes médicinales, *Ranunculus repens L*, Principes actifs, Aglycones, Monoglycosides, di et triglycosides, Activité antistaphylocoques.

Encadreur :

Madame : ROULA Sadjia