

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université de Jijel
Faculté des sciences

MB.08/04

Département de Biochimie- microbiologie

Mémoire de fin d'étude

En Vue De L'obtention Du Diplôme D.E.S
En biologie

Option : Microbiologie

$\frac{03}{23}$

Thème

Extraction et séparation des différents
fractions flavonoïdiques de la plante
Ranunculus repens L
et évaluation de l'activité antibactérienne
sur quelques espèces des bacilles Gram négatif

Promoteur :

M^{me} Roula Sadjia

Président :

M^r KEBIACHE . M

Examineur :

M^r BOUDJERDA. D

Présenté par :

❖ BOUDIB Soumia

❖ ZAIMECHE Messaouda



Promotion 2003/2004

Handwritten Mikeli ecke

SOMMAIRE

Introduction	
I- Analyse bibliographique	
1- Les plantes de la médecine (phytothérapie)	1
2- Les principes actifs	1
3- Les Renoncules	1
3-1- familles des Renunculacées	1
3-2- Genre : Ranunculus	2
3-2-1-Ranunculus repens	2
a- Systématique	2
b- Caractères de la plante	4
4- Les principes actifs	5
4-1- Les alcaloïdes	5
4-2- Les flavonoides	5
4-2-1- La structure et la classification des flavonoides	6
a- La structure	6
b- La classification	6
4-2-2- Propriétés des flavonoides	7
4-2-3 Activité des flavonoides	7
4-2-4- Rôles des flavonoides	8
5- Les antibiotiques	10
5-1- Définition	10
5-2- Classification	10
5-3- Sensibilité aux antibiotiques	11
5-4- Résistance des micro-organismes	12
6- Les bacilles gram négatif	13
6-1- Famille des enterobacteriaceae	13
6-1-1- <i>E.coli</i>	13
6-1-2- <i>Klebseilla</i>	13
6-1-3- <i>Ctrobacter</i>	13
6-1-4- <i>Enterobacter</i>	13
6-1-5- <i>Salmonella</i>	13
6-1-6- <i>proteurs</i>	14
6-2- famille des <i>pseudomonoceae</i>	14
II- Matériels et méthodes	16
1- Matériel	16
1-1- Matériel végétal	16
1-2- Souches bactériennes	16
1-3-Autre matériels	16
2- Méthodes	17
2-1- Isolement les germes	17

2-2- Identification	17
2-3- préparation de l'extrait de plante	18
2-4- préparation des dilutions de l'extrait de la plante Ranunculus repens	22
2-5- Souches utilisées	22
2-6- Evaluation de l'activité anti-bacille gram négatif	23
2-6-1- préparation de inoculum et ensemencement	23
III- Résultat :	
1- teste de diffusion sur milieu solide	24
1-1- Résultat de l'activité des souches avec les aglycones.	24
1-2- Résultat de l'activité des souches avec les monoglycosides.	25
1-3- Résultat de l'activité des souches avec les polyglycosides.	26
Discussion	28
Conclusion	29
Références bibliographiques	
Annexe	



Remerciements

Nous tenons à remercier très particulièrement notre encadreur Mme ROULA Sadjia pour nous avoir dirigé dans la réalisation de ce travail, son soutien et sa disponibilité tout en lui exprimant notre gratitude et notre respect le plus profond.

Nous remercions également :

Les membres du jury :

- BOUDJARDA Djamel
- KEBIECHE Mohamed

Les techniciens du laboratoire de biologie du centre universitaire de jijel.

Toute notre famille.

Toute personne ayant contribué à l'élaboration de ce travail de près ou de loin.

intro ction

INTRODUCTION :

L'utilisation thérapeutique des plantes remonte à la nuit des temps et l'on en retrouve la trace dans à peu près toutes les civilisations, sur les cinq continents.

La notion de tradition reste particulièrement attachée à cette thérapeutique. Cette tradition reste vive dans certains pays, le notre en particulier. L'utilisation thérapeutique des plantes médicinales s'est peu à peu estompée, au profit de la synthèse de molécules chimiques. Cependant depuis une dizaine d'années, on constate un vif regain d'intérêt pour les plantes médicinales qui ne cesse de croître aujourd'hui (10).

De nombreux médicaments renferment des principes actifs extraits des plantes médicinales.

C'est dans ce sens que nous tenons à vous présenter cette étude ; qui portera sur la plante *Ranunculus repens* L qu'on trouve dans les zones humides et qu'on a obtenu des monts de BENI BELAID dans la wilaya de Jijel.

Notre objectif principal concerne la séparation des différentes fractions flavonoïques , de la plante *Ranunculus repens* L pour ainsi tester leur efficacité sur les bacilles Gram négatif isolées de différents produits pathologiques (pus, urines, prélèvements vaginaux, foie de poulet), au niveau du laboratoire d'hygiène de la wilaya de JIJEL.

an **se**

biblio **phique**

I- ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE :

1-LES PLANTES DE LA MEDECINE (PHYTOTHERAPIE) :

La phytothérapie est une médecine qui utilise des plantes –ou la seule " partie active "de ces plantes ayant des propriétés thérapeutiques. Ces plantes sont appelées "plantes médicinales"(10).

2-LES PRINCIPES ACTIFS:

Le ou les principes actifs d'une plante médicinale sont les composant naturellement présents dans cette plante ; ils lui confèrent son activité thérapeutique. Ces composants sont souvent en quantité extrêmement faible dans la plante: ils représentent quelques pour-cent 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 médicinales. Il est donc nécessaire de réaliser une extraction qui va isoler la seule fraction intéressante de la plante et vous dispensera d'absorber les éléments inactifs de celle-ci. Ainsi, on disposera sous un volume très restreint, de l'essentiel du végétal. De plus, libérés de leur support végétal, les principes actifs sont mieux et totalement assimilés par l'organisme. De tous temps d'ailleurs, depuis que l'on utilise les plantes en médecine (11).

3- Les renoncules :

Plantes herbacées, les renoncules (genre *Ranunculus*) appartiennent à la famille des renonculacées.

La renoncule la plus connue est le bouton d'or dont les fleurs d'un jaune très vif ont un aspect vermissé. Il existe également des espèces à fleurs blanche : les renoncules de montagne, les renoncules d'eau ou grenouillettes, les feuilles des renoncules ont généralement un contour anguleux ou même découpé, ce découpage peut être poussé à l'extrême chez les espèces aquatiques (18).

3-1- FAMILLES DES RENONCULACEES :

La famille des renonculacées qui selon les botanistes comprendrait une quarantaine de genre et 1500 à 1800 espèces, et sont le plus souvent des végétaux herbacé par un rhizome ou un tubercule, elles sont ré pondues dans la zone tempérée ou froide de l'hémisphère Nord (2).

- Les feuilles : alternes en générale simples ou composées.
- Les fleurs solitaires en inflorescence de diverses sortes presque toujours très visibles, fleurs hermaphrodites à sépales et pétales parfois peu distincts ou insérés de façon similaire en une vertille étamine, très nombreux ovaires constitués de nombreuse carpelles nom soudés entre eux donnant.
- Le fruit est un akène ou un follicule, parfois une baie, une drupe ou une capsule (18).

3-2- GENRE : RANUNCULUS :

Appelé aussi bouton d'or, en latin : ranunculus vent dire 'grenouille'

Les espèces les plus courantes sont la renoncule âcre (*Ranunculus âcris L*), la renoncule bulbeuse (*Ranunculus bulbosus L*) et la renoncule rampante (*Ranunculus repens L*) (22).

3-2-1- *Ranunculus repens L*:

a- Systématique :

- ✓ Groupe végétal : herbacées terrestres.
- ✓ Phylum : dicotylédone.
- ✓ Famille : Ranunculaceae.
- ✓ Ordre : Ranale ou polycarpique.
- ✓ Subclasse :Renonculoide.
- ✓ Genre : Ranunculus
- ✓ Espèce : *Ranunculus repens L*.
- ✓ Nom arabe : mergheris.
- ✓ Nom scientifique: *Ranunculus repens L*.
- ✓ Nom commun : Renoncule rampante.
- ✓ Synonyme du nom commun : bouton d'or, bassinet, pied de poule.
- ✓ Nom commun en anglais : creeping buttercup (17) .



Schéma 2 : La plante *Ranunculus repens* L.

b- Caractères de la plante :

Origine de nom : le nom de genre signifie petite grenouille car certaines espèces vivent dans endroits marécageux.

Description de la semence : Dimension :2,0-3,5 mm.

Couleur : jaune, brun

Forme : lenticulaire (un coté plus bombé que l'autre

Marginée à bac grêle en crochet de 0,5 à 1mm.)

Ornementation :paroi, verruqueux.

Fruit contenant les graines : Akène (16).

Description de la plante adulte :

Hauteur :30 à 40 cm, Tige florifère, ascendante plusieurs fois divisée, sillonnée.

Feuilles velus, radicale largement, pétiolées, tripartites lobes eux. Mêmes profondément divisée, lobe médiaux à long pétiolule, feuilles caulinaires, Supérieures petites, presque sessile.

Fleurs jaune, isolées terminales, sépales dressés, fruit ovale, lisse, a bec court (2,5 à 3 mm)fruits nombreux (17).

Période récolte :

La plante est plus riche en principe actif, un peu avant la floration, mais elle conserve plus au moins ses caractéristique toute la saison (16).

Habitat et distribution :

Elle pousse dans les lieux frais, le long des routes, dans les lieux humides et perturbés ainsi que dans les champs (17).

Ecologie :

Cette espèce a été introduite d'europe, mais on pense que certaines variétés peuvent être indigènes dans certaines de nos régions (17).

Usage :

Plusieurs nombres du genre ranunculus, dont cette espèce, contiennent des substances toxiques. Lorsqu'on les avale, elles peuvent causer des irritations sévères de la peau ainsi que des inflammations des tissus de la bouche, de la gorge et du système digestif (17).

La plante *Ranunculus repens L* contient des composants chimiques diverse dont les plus importants sont : les alcaloïdes et les flavonoides.

4- LES PRINCIPES ACTIFS :

Les principaux actifs des plantes médicinales appartient essentiellement deux grandes familles chimiques de molécules : Les alcaloïdes, les flavonoides (7).

4-1-LES ALCALOÏDES :

Les alcaloïdes sont des substances azotées complexes produites par un organisme végétal. Plus ou moins basiques. D'origine naturelle, ils sont issus au moins pour partie du métabolisme des acides aminés, et possèdent des propriétés pharmacologiques marquées (1). Actuellement plus de 200 alcaloïdes sont connus, ils sont présent pour l'essentiel dans les plantes supérieurs (environ 10à 15% des plantes vasculaire), en majorité sous forme de sels d'acides organiques parmi les angiospermes (plante à fleurs), ce sont souvent les plantes de la classe des dicotylédones qui contient des alcaloïdes (15).

On les rencontre plus rarement dans les monocotylédones ou dans les gymnospermes, ils apparaissent sous forme de sels dans les vacuoles des cellules végétales, celles des feuilles, des fleurs, des fruits, des graines ou des écorces, le plus généralement dans des tissus jeunes (15).

4-2- LES FLAVONOÏDES:

Les flavonoides sont des molécules retrouvés dans toutes les parties des végétaux supérieurs : racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, grains, et bois (14), et absents chez les algues, ils font leur apparition chez les mousses, chez les fougères et les conifères, leur variété structurale et encore faible : elle est maximale chez les plantes à fleurs (5).

Les flavonoides sont des pigments jaunes responsable de la couleur de certains fleurs (dérivés du mot grec "flavus" qui vent dire : jaune)(1), et représentent un groupe de métabolite secondaires complexes. Comportant plusieurs familles, et un groupe des composés phénoliques les plus diversifiés plus de 4000 flavonoides ont été identifiés (9).

La plupart des flavonoïdes se trouvent sous formes d'aglycones et des glucosides soluble dans l'eau, localisés généralement dans les vacuoles des cellules et très rarement dans le cytoplasme. Les flavonoïdes glucosylés ont été détectés dans le chloroplaste dans les feuilles des quelques plantes (5).

4-2-1- LA STRUCTURE ET LA CLASSIFICATION DES FLAVONOÏDES :

a-La structure :

Les flavonoïdes possèdent un squelette de base à quinze (15) atomes de carbone constitué de deux cycles en C₆ (A et B) reliés par un chaîne en C₃ (14).

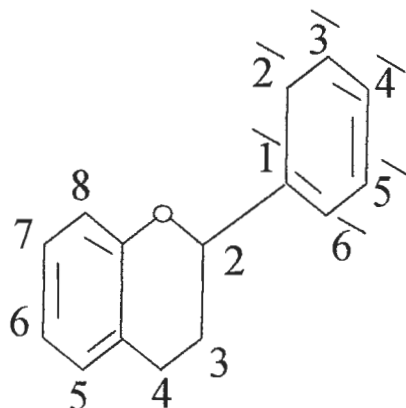


Schéma 1 : la structure commune à tous les flavonoïdes.

b)Classification :

les flavonoïdes appartiennent biochimiquement en fonction de leur structure à la famille des benzopyrones ou du chromane.

Les composés vus de chaque classe se distinguent par le nombre, la position et la nature des substituants (groupements hydroxyle et autres) sur les deux cycles aromatiques A et B et la chaîne en C₃ intermédiaire (14).

Les flavonoïdes se répartissent en quinze familles de composés dont les plus importants sont les suivants : (flavones, flavonoles, isoflavones, urones, anthocyanidols) (22).

Flavones : présente sous forme libre chez les primaires farineuse (5).

Flavonoles : possèdent en plus des hydroxyles en 6 ou 8 (4).

Chalcones : sont dépourvues de l'hétérocycle central (4).

Aurones : sont caractérisées par une structure de 2-Benzylide (4).

Isoflavones : sont caractérisées par leurs propriétés oestrogéniques (4).

Anthocyanidols : sont des aglycones des anthocyanes existent en milieu acide sous la forme cationique (4).

4-2-2- PROPRIETES DES FLAVONOÏDES :

Certaines flavonoïdes sont plus spécifiques de certains tissus, les anthocyanes sont plutôt localisées dans les parties externe des fleurs et feuilles. Les chalcones se retrouvent dans les pétales des fleurs. Ce sont des pigments naturels au même titre que les chlorophylles (couleur verte) et les caroténoïdes (nuances) (jaunes et orangées) (8).

Leurs fonction principale est la pigmentation des plantes (les flavonoïdes, en particulier les anthocyanes, sont les seuls molécules du règne végétal, capable de produire une vaste gamme de couleurs) (8).

Un des rôles de la couleur chez les plantes est d'attirer des insectes et cela ont fin de déclencher la fécondation. On peut également noter que les flavonoïdes, en repoussant certains insectes par leurs goûts désagréables, peuvent également jouer un rôle dans la protection de ces plantes (14).

4-2-3- Activité des flavonoïdes:

*** Activité antioxydante :**

L'activité antioxydante réside dans les radicaux libres, ce sont les formes réactives de l'oxygène qui détiennent un électron non apparié, hyperactifs et qui de plus peuvent attirer un électron des molécules adjacentes pour remplir la vacance de leur orbite (19).

Les radicaux libres sont dits agressifs et peuvent même causer des dommages et des lésions sur l'ADN et donc les protéines et peuvent surtout nuire aux lipides membranaires.

Les flavonoïdes ont la capacité de capturer les radicaux libres (19).

*** Activité anti-cancéreuse :**

De nombreuses expérimentations ont démontré que les flavonoïdes agissent dans le cadre médical en inhibant la croissance et le développement des cellules

cancéreuses, elle ont donc pour effet d'agir sur les cellules tumorales afin de nous protéger contre le cancer (21).

*** Action sur la perméabilité capillaire :**

Les flavonoïdes diminuent la perméabilité des capillaires selon deux modes : direct avec participation de la vitamine C et indirect .

*** Activité anti-inflammatoire :**

Les flavonoïdes ont une propriété anti inflammatoire grâce-à leur capacité de réagir contre les histamines et d'autres médiateurs d'inflammation(20).

***Activité anti-diabétique :**

Inhiber l'enzyme qui convertit le glucose en sorbitol, composé relié aux complications diabétique et améliorer la sécrétion de l'insuline et protègent les cellules pancréatiques qui peuvent être endommagées par les radicaux libres (20).

*** Action sur les maladies cardio-vasculaire :**

Plusieurs études ont démontré que l'addition des flavonoïdes à la diète diminue le cholestérol (19).

* les flavonoïdes présente plusieurs autres activités à savoir : une activité antibactérienne et antivirale.

4-2-4- ROLES DES FLAVONOÏDES :

-Rôle biologique :

***Rôle attractif :**

Le rôle des flavonoïdes dans l'évolution plantes-animaux est évident, en donnant leur couleur aux fleurs et aux fruits, ils participent aux processus de pollinisation et de dispersion (5).

***Rôle protecteur :** des composés du groupe des isoflavonoïdes fonctionnent comme phytoalexines : ces derniers principalement chez les légumineuses, sont synthétisés comme défense contre le stress (micro-organisme infectieux, froid, rayons ultra violet) (5).

***Rôles adaptatif :** jouer un rôle dans les chaînes d'oxydoréduction (8).

-Rôle physiologique : les flavonoides jouent un rôle dans :La croissance, la respiration, la morphogenèse, ainsi les équilibres enzymatiques interviendraient à différent stades du développement (8).

5-LES ANTIBIOTIQUES :

5-1- DEFINITION :

L'antibiotique est « 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 ».

L'étendue de l'activité antibactérienne d'un antibiotique définit son spectre. Plus un antibiotique détruit de type de bactéries différents, plus son spectre est large.

Il faut savoir que les antibiotiques n'ont aucune action sur les virus (13).

5-2-CLASSIFICATION :

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 1: Principaux antibiotiques (12).

	Familles ou molécules	mode d'action	Principales molécules	Spectre
Antibiotique à effets bactériostatique	Quinolones	Inhibition de la synthèse des acides nucléiques	Acide oxalinique Acide piromidine	Spectre étroit : bacilles à Gram négatif. Spectre large
	Sulfamides	Inhibition de la synthèse des folates.	Sulfadoxine sulfamoxole	Spectre large (sauf certains entérocoques et les lactobacilles)
	Tétracyclines	Inhibition de la synthèse des protéines	Chlorotétracycline doxycycline, tétracycline	Spectre large
	Macrolides	Inhibition de la synthèse des protéines	Erythromycine Roxithromycine Spiramycine	Spectre étroit: bactérie à Gram positif, coques à Gram négatif, bacilles à Gram positif
Antibiotique à effets bactéricides	Aminosides	Inhibition de la synthèse des protéines	Gentamicine Streptomycine Tobramycine	Spectre large : les streptocoques et les listeria sont peu sensibles et les bactéries anaérobies résistantes
	Polypeptides	actifs sur les membranes	Bacitracine Gramicidine tyrocidine	Spectre étroit : bactéries à gram positif
	Béta-lactamine	inhibition de la synthèse du péptidoglycane	Méticilline oxacilline	Spectre étroit Ces molécules sont moins actives que la pénicilline G mais inactive par les pencillinases, notamment celle du staphylocoque

5-3- SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUE :

Les antibiotiques sont les médicaments des infections bactériennes, ils sont inefficaces sur les virus.

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 (13).

5-4- RESISTANCE DES MICRO-ORGANISMES :

Une bactérie peut devenir résistante à un antibiotique du jour au lendemain.

- Elle a, à sa disposition, toute une gamme de mécanisme pour devenir résistante.
- Elle peut bloquer l'antibiotique et l'empêcher de pénétrer dans sa structure.
- Elle peut modifier la cible que cherchait à joindre l'antibiotique.
- Elle peut diriger la synthèse d'enzymes inactivant son action.
- Elle peut excréter l'antibiotique qui a réussi à pénétrer mais sans pouvoir agir (13).

6- LES BACILLES GRAM-NEGATIF :

6-1- FAMILLE DES *ENTEROBACTERIACEAE* :

Classification et définition :

Les familles des *Enterobacteriaceae* est constituée de genres bactériens, qui sont rassemblés en raison de leurs caractères bactériologiques communs :

- Ce sont des bacilles à Gram négatif, dont les dimensions varient de 1 à 6 µm de long, et 0.3 à 1 µm de large.
- Mobiles par une ciliature péritriche ou immobiles.
- Se développent en aéro-anaérobiose, et sur gélose nutritive ordinaire.
- Fermenter le glucose avec ou sans production de gaz.
- Ne possédant pas d'oxydase.
- Réduisent les nitrates en nitrites.
- Cultivent facilement sur les milieux ordinaires à PH neutre à une température de 37°C.

Certains genres décrits dans la famille des *entreobacteriaceae* :

Escherichia, Klebsiella, proteus, citrobacter, Enterobacter, Salmonella (3).

6-1-1- *Escherichia Coli* : *Escherichia coli* est un Bâtonnets de 1 à 3 µ sur 0.5. avec formes coccoides et formes filamenteuses très longues, isolé, en paires, ou en chaînes, mobile par cils péritriches (3).

6-1-2 *klebsiella* : Le *klebsiella* est un bâtonnets de 4 à 5 sur 0.3 à 0.5 µ ; à extrémités arrondies, isolé ou en paires, en capsulé (3).

6-1-3- *Citrobacter* : *Citrobacter* sont des entérobactéries mobiles, ayant en commun la capacité d'utiliser le citrate comme seule source de carbone (3).

6-1-4- *Enterobacter* : *enterobacter* est une entérobactéries mobiles et souvent résistantes aux antibiotique (3).

6-1-4- *Salmonella* : Le *salmonella* est un bâtonnets de 3 à 4 µ sur 0.6 µn ; isolé, pathogènes exclusivement pour l'homme et l'animale et sont des bactéries qui cultivent bien sur milieu ordinaire (T=°37c°, ph=7) (3).

6-1-5- *Proteus* : Le *proteus* est un bâtonnets de 1 à 3 μ sur 0.5 à 1 μ , isolé ou en paires et en longues, Aéro-anaérobies facultatifs ; à métabolisme respiratoire et fermentaire pouvant apparaître en formes très courtes dans les produits pathologiques(3).

6-2- Famille des *pseudomonaceae* :Le genre *pseudomonas* de la famille *pseudomonaceae* comprend à 101 d'espèce peuvent répondre au critère suivant :

- Bacille Gram négatif.
- bâtonnets droits et fins 0.5 à 1.3 μ m..
- Mobilité très vive en aérobiose. Ciliature polaire : monotriche –multitriche pour les espèces.
- multitriches le type de ciliature ne peut être établi que statistiquement en déterminant l'index flagellaire (3).

Tableau 2 : Ci dessous résume les caractères d'identification des *Entérobactérie* le plus fréquemment rencontrés(3).

Espèces caractères	<i>Esherichia</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Proteus</i>	<i>pseudomonas</i>
Glucose	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	- (Sauf <i>S.arizonae</i>)	-	+
Indole	-	-	-	+/-	-	+/-	-
Mobilité	+	+	+	-	+	+	-
Urée	-	-	-	+	-	+	+
H2S	-	+/-	-	-	+/-	+/-	+

mat **riels**
mét **odes**

II- MATERIELS ET METHODES

L'objectif principal de notre étude est la détermination de l'activité d'un extrait de *Ranunculus repens L* sur les bacilles Gram négatif : cela nécessite de test de diffusion en gélose par méthodes des puits in-vitro au niveau du laboratoire.

1- MATERIELS :

1-1- Matériel végétal :

La plante *Ranunculus repens L* à été récolté dans les plaines de BENI BELAID à la fin d'Avril 2004 .

1-2-Souches bactériennes :

Les souches de bacilles Gram négatif ont été isolées de différents produits pathologiques (urines, prélèvement vaginaux , pus, foie de poulet) au niveau du laboratoire d'hygiène de la wilaya de Jijel.

1-3-Autres matériels :

- Flacons stériles
- Boite de pétri
- Pipettes pasteur
- Pipettes graduées
- Anse de platine
- Becher
- Entonnoir
- fioles
- flacons stériles
- bain marie
- micro pipettes
- papier filtre
- papier watman
- bec bunsen
- tubes à essais stériles
- spatule



-Appareils utilisés :

- Rota-vapeur
- Balance
- étuve
- Réfrigérateur
- Broyeur

-Milieux utilisés :

- Gélose nutritive
- gélose Mueller-Hinton
- bouillon nutritif
- Eau Physiologique

-Solvants et Réactifs :

- éthanol
- eau distillée
- hexane
- éther de pétrole
- acétate d'éthyle
- éther diéthyl
- n- butanol

2- METHODES :

2-1- Isolement les germes :

Après le prélèvement, on repique les germes en les ensemençant sur la gélose nutritif.

2-2- Identification :

L'identification des bactéries bacilles GRAM négatif est basée sur l'utilisation de la galerie biochimique.

Tests utilisés :

- Fermentation des sucres (milieu TSI).
- Recherche d'une uréase.
- Recherche d'indole

-Recherche de mobilité

Caractères biochimiques :

le tableau suivant présente les caractères biochimiques de quelques souches utilisés dans notre étude .

tableau3: les caractères biochimiques des souches utilisées (3).

Caractère Espèce	Glucose	Lactose	Saccharose	Mobilité	Uréase	Indole	H ₂ S
<i>E.Coli</i>	+	+	+	+	-	+	-
<i>Pseudomonas</i>	+	+	+	-	+	-	+
<i>Salmonella</i>	+	-	+	+	-	-	+

2-3- PREPARATION DE L'EXTRAIT DE PLANTE :

- **Séchage** : Après avoir amené de la plante au laboratoire on l'a séché en l'exposant à l'air pendant 3 jours puis on l'a mise dans une étuve à 35 C° pendant 2jours.

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

- **Extraction hydro-ethanolique** : nous avons pris 31 g du matériel végétal avec 500 ml de l'éthanol dilué à 75% (soit 35 ml d'éthanol+150ml d'eau distillée). Dans une fiole, et on l'aisse macérer pendant 3jours. Puis on filtre le mélange à l'aide du papier filtre.

- **Evaporation à sec** : on évapore l'éthanol et l'eau de l'extrait en utilisant le rota- vapeur à la température de 79 C°/tour/mn pour obtenir un extrait sec.

- Reprise par l'eau bouillante, on prend l'extrait sec qu'on a obtenu au par avant et on lui ajoute de l'eau selon les quantités suivantes :

10g de matière végétale → 100ml d'eau distillée.

31g de matière végétale → × ml d'eau distillé

×= 310 ml

Nous avons laissé pendant 24 heures, et on le filtre pour la deuxième fois.

Affrontement : l'affrontement se fait par 5 solvants différents:

1- Affrontement par l'éther de pétrole :

Afin d'éliminer la chlorophylle, nous avons ajouté 100ml d'éther de pétrole à la phase aqueuse, après agitation énergique et repos de 10mn, 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.

2- Affrontement par l'hexane :

Pour éliminer les lipides nous avons ajouté 100ml d'hexane à la phase aqueuse. Après agitation énergique et repos de 10 mn on met le mélange dans une ampoule à décantation deux phases sont obtenue :

- Une phase hexane en haut contenant les lipides.
- Une phase aqueuse en bas.

3- Affrontement par l'éther diéthylique :

Dans le but d'extraire les aglycones, sur la phase aqueuse obtenue après affrontement par l'hexane, 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.

4-Affrontement par l'acétate d'éthyle :

Afin d'isoler les monoglycosides, on emploie la même technique que précédemment, mais le solvant utilisé 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.

5-Affrontement par le N-butanol :

Afin d'isoler les polyglycosides, on emploie la même technique que précédemment, mais le solvant utilisé est le N-butanol. De même deux phases sont

: * Une phase N-butanol contenant les polyglycosides en haut.

- Une phase aqueuse en bas.

- Evaporation à sec :

Les différentes phases :

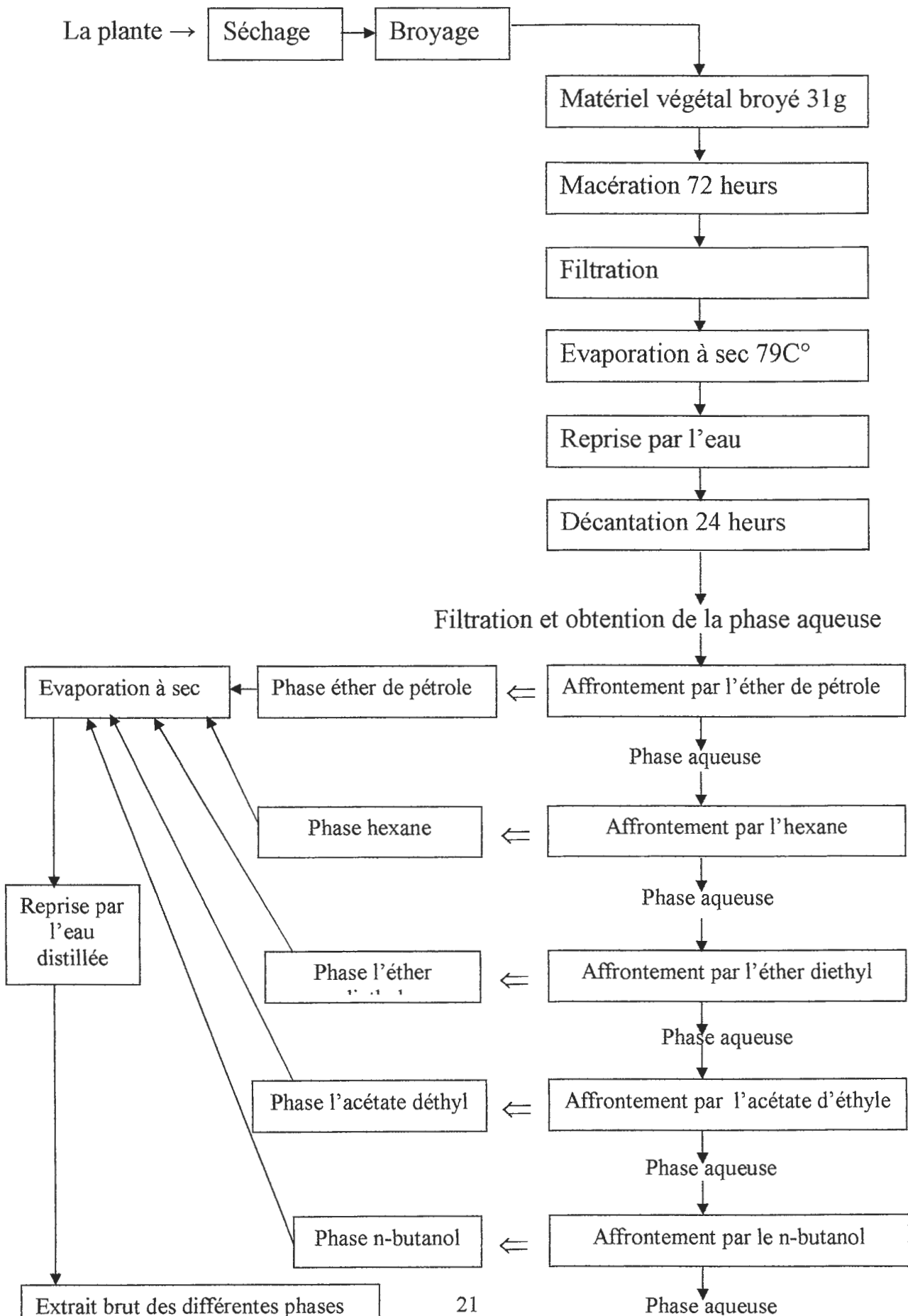
- Phase éther
- Phase acétate d'éthyle
- Phase n-butanol

Nous avons les concentrés à sec :

- Pour la phase éther d'éthylique d'un rotavapeure, la température est de 80°C.
- pour la phase acétate d'éthyle d'un rotavapeure la température est de 80°C.
- pour la phase n-butanol d'une étuve, la température est de 50°C.

Après l'évaporation à sec , on a obtenu:

- $0,66 \times 10^3$ mg des aglycones et pour la récupération on ajoute 44 ml d'eau distillée stérile bouillante. Donc la concentration de la solution est de 15mg/l
- $1,28 \times 10^3$ mg des monoglycosides et pour la récupération on ajoute 85 ml d'eau distillée stérile bouillante. Donc la concentration de la solution est de 15mg/l
- $0,40 \times 10^3$ mg des polyglycosides et pour la récupération on ajoute 26 ml d'eau distillée stérile bouillante. Donc la concentration de la solution est de 15mg/l



2-4-Présentation des dilutions de l'extrait de la plante *Ranunculus repens L* :

Les volumes des fractions flavonoïques et de l'eau physiologique utilisée pour la préparation des dilutions sont représentés dans le tableau suivante :

Tableau 4 : les dilutions de l'extrait

Dilution / Volume en μ l	Volume des fractions flavonoïques	Volume de l'eau physiologie	Volume total
<i>1</i>	3000	0	3000
<i>1/2</i>	1500	1500	3000
<i>1/5</i>	0600	2400	3000
<i>1/10</i>	0300	2700	3000
<i>1/15</i>	0201	2799	3000
<i>1/20</i>	0150	2850	3000

2-5- Souches utilisées

Le tableau suivant présente les germes utilisés dans notre étude avec leurs origines pathologiques.

Tableau 5 : les germes utilisé isolés de déférents produits pathologiques.

Les bactéries	Les produits pathologiques
<i>1- E. coli</i>	Pus
<i>2- Pseudomonas</i>	Urine
<i>3- E.coli</i>	Prélèvement vaginaux
<i>4- Pseudomonas</i>	Pus
<i>5- E.coli</i>	Urine
<i>6- E.coli</i>	Urine
<i>7- Pseudomonas</i>	Pus
<i>8- E.coli</i>	Foie de poulet
<i>9- Salmonella</i>	Foie de poulet
<i>10- Salmonella</i>	Foie de poulet

2-6- Evaluation de l'activité anti-bactérienne sur les bacilles Gram négatif :

2-6-1-Préparation de l'inoculum et ensemencement :

Nous avons mis 10ml d'eau physiologique avec une goutte du bouillon nutritif contenant le germe étudié dans un tube à essai stérile et on homogénéise la suspension par agitation.

*Ensemencement:

- Couler la gélose Mueller–hinton sur les boites de pétri et on les laisse refroidir.
- Nous avons ensemencé la totalité de la surface gélosée sèche avec quelques millimètres de l'inoculum bactérien.
- Aspirer le liquide en excès à l'aide d'une pipette pasteur, puis le mettre sécher 20 minutes à 37C⁰.

*Teste de diffusion en gélose :

Méthode des puits :

- Préparer 06 puits dans chaque boites ensemencée et séchée (la diamètre de chaque puits est de 4 m.m).
- Ajouter dans chaque puit 50 µ l de chaque dilution de l'extrait de façon à réaliser une gamme de concentration croissante.
- Il est important d'observer une prédiffusion de l'extrait de 30 mn à température ambiante, et de porter les boites à l'étuve.
- incubation à 37 C⁰ pendant 18 heures

rés tats

III- RESULTAT :

1- TESTE DE DIFFUSION SUR MILIEU SOLIDE :

1-1- Résultat de l'activité des souches avec les aglycones :

Le tableau ci dessous représente les résultats du test d'activité des différentes dilutions des aglycones sur milieu solide.

Tableau 8 : les résultats du test d'activité des différentes dilutions des aglycones sur milieu solide.

<i>Les souches</i>	<i>Aglycones</i>					
	<i>Les dilutions</i>					
	<i>1</i>	<i>1/2</i>	<i>1/5</i>	<i>1/10</i>	<i>1/15</i>	<i>1/20</i>
1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-

(-)= colonies réparties sur toute la surface de la gélose.

Aucune des bactéries bacilles Gram négatif n'a manifesté la moindre sensibilité pour les aglycones, vu qu'on a pas constate la formation des zones d'inhibition entre les aglycones et les suspension bactériennes (**schéma 4.5.6**).

III-1-2- Résultats de l'activité des souches avec les monoglycoside :

Le tableau ci dessous est représente les résultats du test d'activité des différentes dilutions des monolycosides sur milieu solide.

Tableau 7 : les résultats du test d'activité des différentes dilutions des monolycosides sur milieu solide.

<i>Les souches</i>	<i>Monoglycosides</i>					
	<i>Les dilutions</i>					
	<i>1</i>	<i>1/2</i>	<i>1/5</i>	<i>1/10</i>	<i>1/15</i>	<i>1/20</i>
1	–	–	–	–	–	–
2	–	–	–	–	–	–
3	–	–	–	–	–	–
4	–	–	–	–	–	–
5	–	–	–	–	–	–
6	–	–	–	–	–	–
7	–	–	–	–	–	–
8	–	–	–	–	–	–
9	–	–	–	–	–	–
10	–	–	–	–	–	–

Les monoglycosides ne montrent aucune activité sur les souches utilisées, vu qu'on a pas constate la formation des zones d'inhibition entre les monoglycoïdes et les suspension bactériennes (**schéma 4.5.6**).

III-1-3- Résultat de l'activité des souches avec les polyglycosides :

Le tableau ci dessous est représente les résultats du test d'activité des différentes dilutions des polyglycosides sur milieu solide.

Tableau 8 : Les résultats du test d'activité des différentes dilutions des polyglycosides sur milieu solide.

<i>Les souches</i>	<i>Polyglycosides</i>					
	<i>Les dilutions</i>					
	<i>1</i>	<i>1/2</i>	<i>1/5</i>	<i>1/10</i>	<i>1/15</i>	<i>1/20</i>
1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-

Aucune des bactéries bacilles Gram négatif n'a manifesté la moindre sensibilité pour les polyglycosides, vu qu'on a pas constate la formation des zones d'inhibition entre les polyglycosides et les suspension bactériennes (**schéma 4.5.6**).



Schéma 4 : méthode de diffusion en gélose testé sur pseudomonas

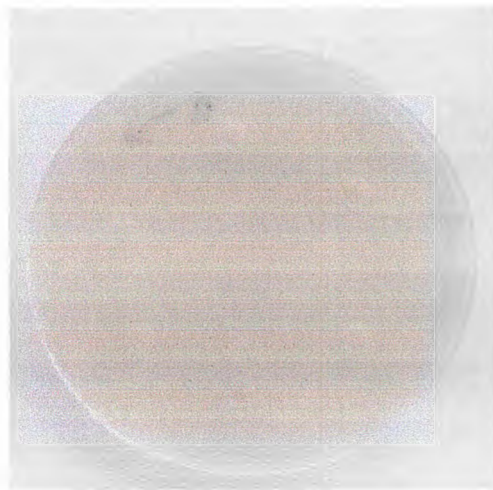


Schéma 5 : méthode de diffusion en gélose testé sur salmonella.

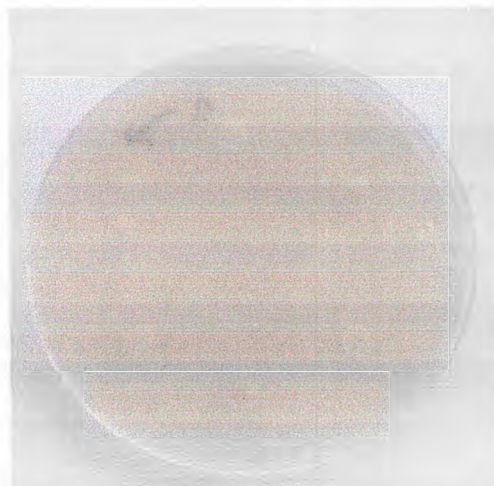
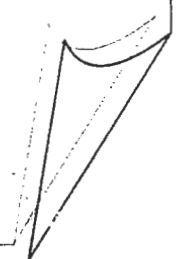


Schéma 6: méthode de diffusion en gélose testé sur E. coli.

disc sion



Discussion :

De nombreux travaux sont effectués aujourd'hui par les biologistes, dans l'optique de l'étude des plantes médicinales.

Ceci est dû à leur importance primordiale et à leur efficacité dans le cadre de la lutte contre toute sortes de maladie dont la thérapie reste toujours une énigme.

L'objectif de notre travail est de rechercher une éventuelle activité anti-bactérienne sur les bacilles Gram négatif à partir des extraits de la plante *Ranunculus repens L* (aglycones, monoglycosides et polyglycosides).

Les résultats de notre étude ont montrés que les différents fractions flavonoïques n'ont aucune activité sur les souches testée (*E.coli*, *Pseudomonas* ainsi que *Salmonella*).

Des études précédentes ont réalisées le même travail mais sur l'extrait brut qui n'a montré aucune activité.

Nous pensons que avant le conclure que ces extraits n'ont aucune activité sur les bacilles Gram négatif, nous proposons de réaliser le même travail sur la même plante mais fraîche, rapporte que la plante *Ranunculus repens* garde son activité.

Nous pensons aussi qu'il faudra approfondir ce travail en réalisant l'extraction en passant par une chromatographie qui pourrait donner un meilleur résultat.

conclusion

Conclusion :

La guérison avec les plantes médicinales est apparue, depuis déjà très longtemps.

Cependant c'est bien pendant cette dernière décennie que les chercheurs lui ont manifesté le plus grand intérêt. Puisqu'elle représenté un vecteur sur lequel on pourrait bâtir une vraie révolution dans le domaine de la recherche phytothérapeutique et pharmaceutique.

Dans notre travail on s'est basé sur l'étude de la *Ranunculus repens L* à partir de laquelle on a extrait diverses fractions de flavonoïdes avec des méthodes chimiques et on a étudié leur effets sur les souches bacilles Gram négatif.

Le résultats s'est montré négatif, ceci indique que l'extrait ainsi analysée n'a aucun effet sur les bacilles Gram négatif, ainsi avant de conclure que les extraits de la plante *Ranunculus repens L* ne peuvent servir de remède aux maladie causées par les souches bacilles Gram négatif, nous proposons de réaliser les extractions par chromatographie.

Références bibliographiques

Livres

- 1-Bruneton j.pharmacognosie phytochimie plantes médicinales. 2^{ème} édition lavoisier, 1993, p 36 -107 - 108 .
- 2- Bruneton j ; plantes toxiques pour l'homme et les animaux. Edition lavoisier, 1996 ; p 395-505.
- 3- Dabernat. h, Monteil.H, bactériologie clinique 2^{ème} lavoisier.j l. avril. 1992.p : 149-185-19-193.
- 4-Gerard-r. métabolisme des végétaux . édition lavoisier. 1993, p 333-337.
- 5- Guignard jean – louis; biochimie végétale , préface de pierre potier membre de l'académie des sciences. 2^{ème} édition (Constantine), p : 171-172-173 -201.
- 6-Johnsoniam antioxydants et anticancéreux biofutur N° 186, février 1999 p : 14-15-16 et 17.
- 7-Lahoual m compte rendu du séminaire national sur les plantes médicinales, institue de biologie, centre universitaire Jijel 2001 p :16.
- 8-Lahouel m, mémoire de fin d'étude, option : biochimie, effet préventif des flavonoïdes (DAFLON 500) sur l'hématotoxicité d'un médicament anticancéreux (cylophosphamide) chez le rat, 2001.
- 9- Regnault-roger Cathrine, biopesticides d'origine végétale. Edition lavoisier 2002, p 169.

Sites Internet :

- 10-<http://www.plante.pharma.com/p.pharma.p.pharma.hsf>.
- 11- http://www.entracoc.com/santé/les_plantes/_principe_actifs.htf
- 12-http://www.dictionnaire.de_bactériologie_vétérinaire://http://www.bactériocict.fr/bacdic/atbq/sensibilité

13-<http://www.gdp.ac-clemot.fr/etablissements/m%C3%A9dicaments/antibiotiques.htm>

14-<http://www.membres.lycos.fr/mourad/flavono%C3%ADde.htm>

15-<http://www.fr.encyclopedia.yahoo.com/artides/htm>

16-<http://www.fleursdeschamps.com/fiches/f242.htm>

17-<http://www.cerman.cnrs.fr>

18-<http://www.plantesauvages.free.fr/index.htm>

19- http://www.reseauproteus.net/fr/solution/plantes_supplements/fiche.aspx?doc=nopal.ps- 43 K.

20- <http://www.naturosante.com/rubrique/hom%C3%A9ophyto/hom%C3%A9ophyto.Php> 730.

21-<http://www.inra.fr/cmh-auvergne/theses/pgtheses.htm>. 30K.

CDROOM:

22-cd-room.encyclop%C3%A9die.universalis2004

Annexe

Composition des milieux utilisés :

1- Bouillon nutritif :

- extrait de viande.....5 gr
- peptone pancréatique.....10gr
- Chlorure de sodium.....5 gr

2- Milieu de gélose nutritive :

- Extrait de viande de bœuf.....1 gr
- Extrait de levure.....2 gr
- Peptone.....5 gr
- Chlorure de sodium.....5 gr
- Gélose.....15 gr

3- Milieu de Mueller – Hinton :

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

Réalisé par :

Date de soutenance : 2 /09/2004

BOUDIB Soumia

ZAIMECHE Messaouda

Thème :

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

المخلص :

الطبيعة تحتوي على العديد من النباتات الطبية, التي قد تتفع في شفاء الأمراض البكتيرية. في عملنا هذا إستعملنا النبتة *Ranunculus repens* L التي توجد في مناطق محددة من ولاية جيجل. تم إستخلاص الفلافونويدات منها ودراسة مدى تأثيرها على البكتيريا العسوية السالبة الجرام. إستعملنا طريقة الإنتشار في الوسط الصلب بتخفيف المستخلصات (Monoglycoside aglycone) (polyglycoside) . النتائج المتحصل عليها بينت عدم تأثير هذه المستخلصات على البكتيريا العسوية السالبة الجرام.

Résumé

La nature contient plusieurs plantes médicinales, qui peuvent servir à la guérison des maladies bactériennes
Dans notre travail, on a utilisé la plante de *Ranunculus repens* L, qui existe dans des régions précises de la wilaya de Jijel. de laquelle on extrait des flavonoides. On étudié leur éventuelle activité sur les souches bacilles Gram négatif .
On a utilisé la méthode de diffusion dans le milieu solide avec des dilutions des extraits (aglycone.monoglycoside .polyglycoside).
Les résultat obtenus n'ont montré aucun effet de cette extraits , sur les bactéries bacille Gram négatif.

The summary

The nature contains several medicinal plants, that can serve to the recovery of the bacterial illnesses
in our work, that we used the plant of *Ranunculus repens* L, that exists in regions of the wilaya of Jijel. of which we extracts some flavonoides. we studied their possible activity on the original bacilli negative Gram.
we used the method of diffusion in the strong environment with dilutions of the excerpts (aglycone.monoglycoside .polyglycoside).
The results gotten, did'nt show any effect of this excerpts, on the bacteria bacillus negative Gram

Les mots clés

Plantes médicinales- extrait de plante- bacilles Gram négatif- antibiotique- activité antibactérienne- flavonoides- *Ranunculus repens* L

Responsable de recherche : ROULA Sadjia