

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

**Ministère de l'Enseignement supérieur
et de la Recherche Scientifique**

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Université M'hamed Bougara de Boumerdes

جامعة امحمد بوقرة بومرداس



Faculté des sciences

Département de biologie

Mémoire de fin d'étude

En vue de l'obtention du Diplôme de Master en Biologie

Spécialité: Biologie des Populations et des Organismes

**Evaluation de l'effet des extraits flavonoïques
d'une plante médicinale *Euphorbia sp* récolté de
Ghardaïa sur les bactéries pathogènes du sol**

Réalisé par :

- Mlle : **CHERARAK Souad**
- Mlle : **MAMMERI Asma**

Soutenues le 08/09/ 2016

Devant le jury composé de :

ARAB BOUCHENAK O.....MCB (UMBB).....Présidente

ARAB K..... Professeur (UMBB).....Promoteur

YAHIAOUI K..... MCA (UMBB).....Examinatrice

BOUMAZA S..... Doctorante.....Co-promotrice

Année universitaire 2015-2016



Remerciements

Nous remercions DIEU qui nous a donné la force et la patience pour terminer ce travail.

Nous exprimons nos sincères remerciements :

A nos promoteurs Mr ARAB.K et Mme BOUMAZA.S pour leur grande aide et patience pour achever ce travail.

A Mme ARAB-BOUCHENAK O d'avoir accepté présider le jury.

On tient également nos vifs remerciements à Mme YAHIAOUI K pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant d'examiner ce mémoire.

A Mr abd al-Karim qui nous a aidé pour faire l'identification de la plant au niveau de laboratoire botanique d'ENSA EL-HARRACH.

A l'equipe de laboratoire de bactériologie de l'établissement public hospitalier de M-CHEDALLAH (BOUIRA) pour leurs aide lors de la période de stage, à leur coopération avec nous et à leur encouragement, sans oublier ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail et ceux qui ont fait l'honneur de jurer ce mémoire.





Dédicace

Je dédie ce modeste travail à :

*A la mémoire de mon père, à ma très chère mère
qui a endurée le bien et le mal pour me voir
réussir;*

A mon très cher frère Anouar;

A mes très chères sœurs Nawal, Noura, Houda;

A toute la famille Cherarak et Tamzought;

A tous mes amis

Souad





Je dédie ce travail à :

La plus belle perle...au cœur le plus tendre...ma chère maman

Celui qui a toujours garnie mon chemin avec force et lumière...mon cher papa

Mes deux chers frères Mouloud et Azzedine

Ma seule sœur Houda et son fiancé Rachid

Mes belle sœurs Kahina et Lilia

Et surtout au petit bout de chou qui a rempli les coins de la maison de ses cris et éclat de rire...ma nièce Tesnym

Mes cousines Nassira, Ouidad

Mes copines Zenza, Iviza, Hanane et Naima,

Sans oublier tous ceux qui étaient là pour moi et m'ont soutenu.

Asma



Liste des abréviations

- **ADH** : Arginine déshydrolyse
- **ADN** : Acide Désoxyribose Nucléique
- **API** : Appareillage et Procédés d'Identification
- **C** : Carbone
- **Cb₁₀₀** : Carbénicilline
- **CCM** : Chromatographie sur couche mince
- **Cip₅**: Ciprofloxacine
- **Cl₂₅**: Clindamycine
- **CLHP** : Chromatographie liquide haute performance
- **CPG** : Chromatographie en phase gazeuse
- **DI** : Diamètre d'inhibition
- **E₁₅**: Erythromycine
- **E.coli** : Escherichia coli
- **ESC** : Esculine
- **Glu** : Glucose
- **GN**: Gélose Nutritive
- **H**: Proton
- **H₂S**: Thiosulfate de sodium
- **IND**: indole
- **IR** : Infrarouge
- **Lac**: lactose
- **LDC** : lysine décarboxylase
- **MAN**: Mannitol
- **Mob**: Mobilité
- **MH** : Mueller Hinton
- **N** : Nord
- **N**: Azote

Liste des abréviations

- **NA₃₀**: Acide Nalidixique
- **Nit** : Nitrate
- **O**: Oust
- **O**: Oxygene
- **O₂-**: Anion superoxyde
- **OH**: hydroxyle
- **OMS** : Organisation mondiale de la sante
- **P** : Phosphore
- **PH** : potentiel d'hydrogène
- **R** : Résistance
- **R²** : Coefficient de corrélation
- **RMN** : Résonance magnétique nucléaire
- **S** : Sensible
- **S**: Sud
- **S.aureus** : Staphylococcus aureus
- **SM** : Spectroscopie de masse
- **sp** : espèce
- **URE** : Urée
- **UV** : Rayonnement ultra-violet
- **V/V** : volume par volume.
- **VF** : viande foie

Liste des figures :

Figure 1 : Partie aérienne d' <i>Euphorbia guyoniana</i>	3
Figure 2 : Zone de répartition d' <i>Euphorbia guyoniana</i>	5
Figure 3 : Squelette de base des flavonoïdes.....	8
Figure 4 : Schéma des sous -classes des flavonoïdes.....	9
Figure 5 : Chalcone et Aurone	10
Figure 6 : Flavones et Flavonols	11
Figure 7 : Dihydroflavonols et Flavanones	11
Figure 8 : Anthocyanes.....	11
Figure 9 : Protocole d'extraction des flavonoïdes.....	25
Figure 10: Méthode de zigzag	27
Figure 11 : Rendement en flavonoïdes obtenus pour <i>Euphorbia</i> sp.....	34
Figure 12 : Courbe étalon de la quercétine.....	34
Figure 13 : Moyennes des diamètres des zones d'inhibition pour l'extrait flavonoïque.....	43

Liste des tableaux :

Tableau1 : Principales bactéries pathogènes présentes dans le sol et les infections causées .	18
Tableau2 : Bactéries pathogènes présentes dans les poulaillers	21
Tableau3 : sensibilité des bactéries aux antibiotiques	30
Tableau4 : Couleur, aspect et rendements massiques de l'extraction.....	32
Tableau5 : Évaluation quantitative des flavonoïdes des extraits d' <i>Euphorbia sp</i>	35
Tableau6 : Résultats de l'analyse par infrarouge des fractions flavonoïques d' <i>Euphorbia sp</i>	36
Tableau7 : Les différents tests classiques réalisés pour l'identification des souches isolées .	38
Tableau8 : Tests de sensibilité aux antibiotiques.....	41
Tableau9 : Diamètre d'inhibition de l'extrait d' <i>Euphorbia sp</i>	42

Introduction	1
--------------------	---

Chapitre I : partie bibliographique

I. description, composition et activité de la plante

I.1.Description botanique	3
I.2.Taxonomie et systématique.....	4
I.3.Répartition géographique.....	4
I.4.Usage de <i>Euphorbia guyoniana</i>	5
I.4.1Utilisation traditionnelle	5
I.4.2.Utilisation contre les bactéries.....	6
I.4.3.Utilisation contre les insectes.....	6
I.5.Composition phytochimique et applications pharmacologiques de la plante.....	7
I.6. toxicité de <i>Euphorbia guyoniana</i>	7

II. Généralités sur les flavonoïdes

II.1.Biosynthèse des flavonoïdes.	8
II.1.1.Biosynthèse du squelette C6-C3-C6.....	8
II.1.2.Biosynthèse des différents squelettes flavonoïques.....	9
II.2.Répartition et localisation	9
II.3.Structure chimique et classification	10
II.4.Intérêt des flavonoïdes.....	12
II.4.1. Rôle biologique et physiologique.....	12
II.4.2.Rôle thérapeutique	12
II.5.Procédés d'extraction des flavonoïdes.....	13
II.5.1.Macération.....	13
II.5.2.Infusion.....	13

II.5.3.Décoction	14
II.5.4.Extraction par solvant volatil	14
II.6.Méthodes de caractérisation des flavonoïdes	14
II.6.1.Méthodes chromatographiques.....	14
II.6.1.1.La Chromatographie sur Couche Mince CCM	15
II.6.1.2.La chromatographie en phase liquide a haute performance HPLC ...	15
II.6.1.3.Chromatographie en phase gazeuse CPG.....	15
II.6.2.La spectrophotométrie.....	15
II.6.2.1.Spectres UV-Visible.....	15
II.6.2.2.Spectroscopie infrarouge IR.....	16
II.6.2.3.Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire RMN.....	16
II.6.2.4.Spectroscopie de masse SM.....	16

III. Généralités sur les bactéries pathogènes d'origine tellurique

III.1 .Principales bactéries pathogène du sol et les infections causées.....	16
III.2.Les bactéries pathogènes trouvées dans les poulaillers.....	20
III.3.Isolement et identification des bactéries pathogènes du sol.....	22
III.4.Lutte biologique contre les bactéries pathogènes telluriques.....	22

Chapitre II : Matériel et méthode

II.1.Matériel.....	23
II.1.1.Matériel végétal.....	23
II.1.1.1.Identification botanique	23
II.1.1.2. Préparation de l'échantillon	23
II.1.2.Souches bactériennes.....	23
II.2.Méthodes	24
II.2. 1.Extraction des flavonoïdes.....	24
II.2.2. calcul de rendement.....	24

II.2.3. Dosage des flavonoïdes par spectromètre.....	26
II.2.4.Caractérisation des flavonoïdes par infrarouge.....	26
II.2.5. Isolement des souches bactériennes	26
II.2.5.1.Prélèvement du sol.....	26
II.2.5.2. Réalisation de la gamme de dilution	27
II.2.5.3. Ensemencement.....	27
II.2.5.4. Identification des souches isolées.....	27
II.2.5.4.1. L'examen à l'état frais.....	27
II.2.5.4.2.Examens macroscopique.....	27
II.2.5.4.3.Examens microscopique.....	27
II.2.5.4.4.Caractères biochimiques.....	28
a. Test catalase.....	28
b. Galerie biochimiques classiques.....	28
II.2.5.5. Sensibilité aux antibiotiques	30
II.2.5.6.Evaluation de l'activité antibactérienne.....	31
II.2.5.6.1. Revivification des souches bactériennes	31
II.2.5.6.2. Repiquage des espèces bactériennes.....	31
II.2.5.6.3. Préparation de l'inoculum.....	31
II.2.5.6.4. Préparation des disques.....	31
II.2.5.6.5. Préparation des milieux de culture	31
II.2.5.6.6.Ensemencement	31
II.2.5.6.7.Expression des résultats	31

Chapitre III : Résultats et discussion

III. Extraction	32
III.1.Rendement	32
III.2.Dosage colorimétrique des flavonoïdes.....	34
III.3.Analyse par infrarouge IR.....	35
III.4.Identification des souches bactériennes isolées.....	38
III.5.Tests de sensibilité aux antibiotiques.....	40
III.6.Evaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait flavonoïques <i>d'Euphorbia sp</i>	42
Conclusion générale	46
Références bibliographiques	
Annexes	



Introduction

Introduction

Introduction:

L'utilisation thérapeutique des vertus extraordinaires des plantes fait partie intégrante des pratiques ancestrales. En effet, l'homme a longtemps employé des remèdes traditionnels à base de plantes sans savoir à quoi étaient dues leurs actions bénéfiques.

Actuellement plus de 50% des médicaments sont d'origines naturels, paradoxalement le règne végétal qui englobe environ 500000 espèces n'a été que partiellement étudié sur le plan chimique et pharmacologique (**Haba., 2008**).

L'Algérie est un pays connu pour sa biodiversité, dispose d'une flore Particulièrement riche et variée. On compte environ 3000 espèces dont 15 % endémiques et appartenant à plusieurs familles botaniques (**Quenzel et Santa., 1963**), le Sahara algérien connu pour son hostilité, dispose pourtant d'un grand potentiel floristique constitué de plantes médicinales, toxiques, et condimentaires. Cette richesse connaît une dégradation intense depuis quelques décennies, les espèces évoluant dans ce milieu tels que les Euphorbiaceae renferment diverses familles de composés chimiques tels que les alcaloïdes (**Nazaré et al., 2005**), les saponines (**Tripathi et al., 1980**), les terpènes (**Mazoir et al., 2008**), les flavonoïdes et les composés cyanogéniques (**Hunsa et al .,1995**).

L'objectif de notre travail est d'étudier l'effet des extraits flavonoïques d'une plante médicinale *Euphorbia sp* sur les bactéries pathogènes telluriques isolées de quelques poulaillers. L'étude sera manipulée au niveau de la faculté des sciences de l'université M'Hamed bougara.

La stratégie expérimentale comporte les parties suivantes :

- ❖ Partie théorique décrivant la plante utilisée, les flavonoïdes, et les bactéries pathogènes d'origine tellurique.
- ❖ Partie pratique comportant :
 - 1- La récolte de la plante *Euphorbia sp* de la région de Ghardaïa et son identification.
 - 2- Séchage, broyage et conservation de la poudre végétale pour l'extraction des flavonoïdes.
 - 3- Extraction et caractérisation des flavonoïdes par entraînement avec différents solvants organiques.
 - 4- Prélèvement du sol de différents poulaillers.
 - 5- Identification des souches bactériennes prélevées par des galeries biochimiques classiques.

Introduction

- 6- Evaluation de l'effet des extraits flavonoïques sur les souches identifiées.
- 7- Les résultats d'identification des bactéries et des tests d'antibiogramme.
- 8- Discussion des résultats trouvés.
- 9- Et en fin une conclusion et perspectives.



Chapitre I

I. Description, composition et activité de la plante :

I.1. Description botanique :

La famille des Euphorbiaceae avec ses 5000 à 10000 espèces regroupées dans près de 300 genres (Spichigera., 2000) est l'une des familles les plus vastes et les plus cosmopolites que compte le sous embranchement des Angiospermes. Paradoxalement, il s'agit de l'une des moins connue du point de vue systématique. Elle offre plusieurs plantes d'intérêt économique, (Hernández., 2003 ; Manga., 2004 ; Chhabra., 1994 ; Haba., 2008) et d'autres largement utilisées en médecine traditionnelle.

Parmi les espèces représentant cette famille dans le Sahara algérien l'*Euphorbia guyoniana*. Ce nom vient du nom Euphorbos ; le médecin du roi *Juba II* de Mauritanie au 1^{er} siècle avant Jésus Christ, et conservé par Linné (Jassbi., 2006).

Euphorbia guyoniana est une plante laticifère d'un vert foncé, vivace pouvant atteindre 1m de hauteur. La floraison s'échelonne sur les saisons d'hiver et de printemps. Au dessèchement de toute la partie aérienne, la reprise de la croissance se fait durant la saison suivante à partir des bourgeons enterrés dans le sol ou au niveau du sol. Cette espèce s'adapte à la sécheresse par la réduction de la surface foliaire. (Ozenda., 1991). La tige est dressé et non charnue, très ramifiée dès la base portant des feuilles étroites, très peu nombreuses ou absentes surtout sur les rameaux fleuris (Maire., 1933).

Elle présente un système racinaire très développé pénétrant profondément dans le sol (Chehma., 2006). Les graines sont sans caroncule, noirâtres et munies de côtes longitudinales grises. Les fleurs ont des pétales réduits (cyathes) de couleurs jaune vif. Le fruit est une capsule de 4 à 5 mm, contenant des graines ailées, Les feuilles sont très petites, linéaires et alternes se desséchant rapidement. (Ozenda., 1991).



Figure1 : Partie aérienne d'*Euphorbia guyoniana* (Haba.,2008)

I.2. Taxonomie et systématique :

D'après les classifications botaniques classiques, les Euphorbiacées sont classées dans les dicotylédones et l'espèce *Euphorbia sp* est ainsi classée (Quenzel.,1963 ,Ozenda., 1991,Spichiger., 2000,Bruneton., 1996):

Règne : Plantae-plants

Embranchement : Magnoliophyta

Sous-embranchement : Angiospermes

Classe : Magnoliopsida-dicotylédones

Ordre : Malpighiales

Famille : Euphorbiaceae

Genre : *Euphorbia*

La majorité des *Euphorbes* sont connues par leur noms vernaculaires« BOUHLIBA» qui signifie plante à sève laiteuse, car les Euphorbes contiennent un suc laiteux (liquide blanc) collant et irritant appelée latex. Et l'espèce *Euphorbia sp* est connue aussi par son nom * LEBBINA *(Chehma., 2006).

I.3.Répartition géographique :

Euphorbia sp est une plante endémique en l'Algérie (n'est présente a l'état indigène qu'en Algérie) Cette espèce existe dans les endroits sableux, commune dans tout le Sahara septentrional et les régions pré désertique.

Elle est observée en pieds isolés et en petits groupes dans les zones ensablées et a été répertorié également dans le sable de l'étage tropical (Chehma., 2006, Kemassi., 2015).

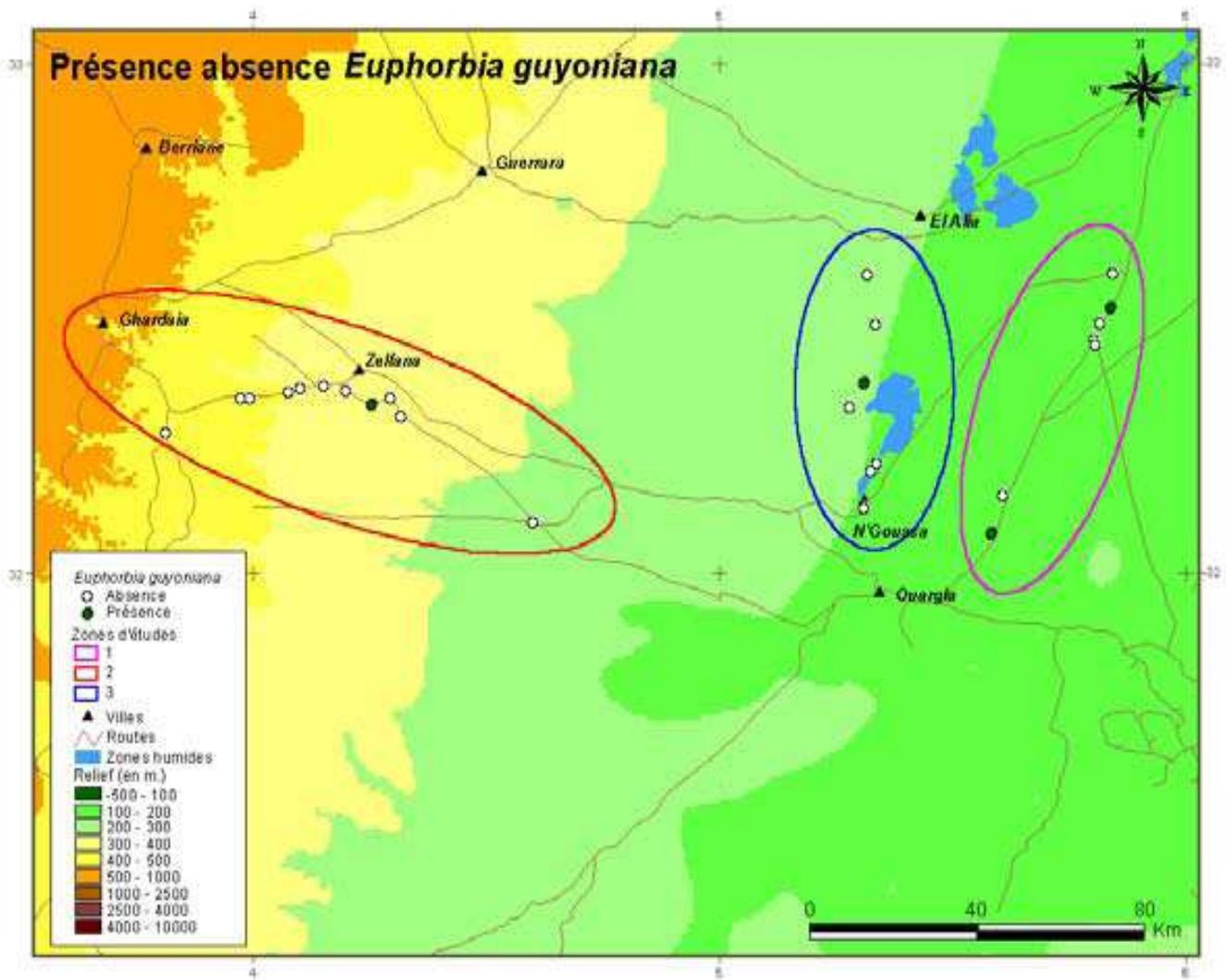


Figure2 : Zone de répartition d'*Euphorbia sp* (Haba.,2008)

I.4. Usage d'*Euphorbia sp* :

En médecine traditionnelle, les Euphorbiacées sont utilisées dans de nombreuses régions du monde dans le traitement de plusieurs affections telles que les maladies gastro-intestinales et la migraine (Singla et Pathak., 1990). Les espèces de cette famille, possèdent des propriétés cicatrisantes, antibactériennes, antifongiques, anti-inflammatoires, anti-tumorale et antivirale (Hernandez et al., 2003 ; Mavar et al., 2004 ; LI et al .,2008).

I.4.1. Utilisation traditionnelle :

Le latex de la plante *Euphorbia sp* est utilisé par les populations locales pour attaquer les verrues et pour extirper les épines. On l'applique également sur les morsures et piqûres venimeuses (Bellakhdar.,1997).

I.4.2.Utilisation contre les bactéries :

Les plantes médicinales peuvent offrir un des agents antibactériens et de nombreuses espèces de plus en plus en Algérie comme *Euphorbia sp*, ont été utilisés comme plantes médicinales dans le traitement des maladies de la peau.

Parmi les travaux les plus récents Un travail qui se concentre essentiellement sur le criblage phytochimique de 5 espèces : *Parentucellia viscosa*, *verbascum signatum*, *Ecbalium elaterium*, *Scabiosa atropurpura* et *Euphorbia sp* dont 250 tests phytochimiques ont été effectués parmi lesquels 67,20% étaient positifs (Zellagui et al.,2012). Il est intéressant de noter la présence de nombreuses classes chimiques telles que flavonoïdes, stéroïdes ou triterpènes, des saponines, des tanins, des caroténoïdes et des alcaloïdes.

En outre, l'évaluation de l'activité antibactérienne d'extrait d'*Euphorbia sp* par l'essai de diffusion sur disque a été réalisée contre six souches de bactéries. L'ordre de la sensibilité des chlorure de méthylène-méthanol extraits bruts a été illustrée par le diamètre de la zone d'inhibition correspondant soit : *Pseudomonas aeruginosa* > *Proteus vulgaris* > *Klebsiella pneumoniae* > *Enterobacter* > *Escherichia coli* > *Staphylococcus aureus*, d'autre part le n-butanol extraire l'ordre de sensibilité était la suivante : *Proteus vulgaris* > *Klebsiella pneumoniae* > *Pseudomonas aeruginosa* > *Staphylococcus aureus* > *Enterobacter* > *Escherichia coli* (Zellagui et al ., 2012).

I.4.3.Utilisation contre les insectes :

En quête de nouvelles techniques pour lutter contre les insectes nuisibles, la possibilité d'utiliser les substances secondaires des plantes, a suscité beaucoup de travaux, les plus récents sont ceux de (Kemassi et al., 2015) où ils ont démontrés que les extraits aqueux d'*Euphorbia sp* exerçait sur les larves comme sur les adultes des insectes une :

- Action sur la prise de nourriture : les études sur l'activité biologique des extraits d'*Euphorbia guyoniana* sur les insectes révèle une abstinence et une diminution significative de la prise de nourriture.
- Action sur la croissance pondérale.
- Action sur la mortalité.

I.5. Compositions phytochimiques et applications pharmacologiques de *Euphorbia sp*:

Les plantes du genre *Euphorbia* ont fait l'objet de nombreuses investigations phytochimiques et pharmacologiques. Les études phytochimiques réalisées sur l'espèce *Euphorbia sp*, a abouti à l'isolement des flavonoïdes, et environ 20 composés terpéniques (5 diterpénoïdes et 15 triterpénoïdes) a partir des racines (Smara., 2014). Ces composés obtenus à l'état pur par l'utilisation souvent combinée de différentes méthodes chromatographiques.

Les composés identifiés appartiennent à quelque classe de métabolites secondaires comme: les flavonoïdes, diterpène, les triterpènes et les stéroïdes qui sont souvent présents dans les plantes du genre *Euphorbia*. Ils se répartissent comme suit (Smara., 2014;Haba., 2008):

- Un diterpène polycyclique nouveau à squelette tigliane, dérivé du phorbol.
- Un diterpène macrocyclique à squelette jatrophan.
- Quatre triterpènes tétra cycliques à squelette cycloartane.
- Deux triterpènes tétra cycliques à squelette lanostane.
- Un triterpène tétra cyclique à squelette euphane.
- Un triterpène tétra cyclique à squelette tirucallane.
- Deux triterpènes penta cycliques à squelette multiflorane.
- Un triterpène penta cyclique à squelette taraxerane.
- Un triterpène acyclique.
- Deux stéroïdes.

Ces études montrent la richesse des plantes du genre *Euphorbia* en métabolites secondaires, qui se répartissent principalement en : terpène et flavonoïdes (Singla et Pathak., 1990). Ces derniers sont d'ailleurs utilisés comme marqueurs chimio taxonomiques (Haba., 2008).

I.6.Toxicité d'*Euphorbia sp* :

Le latex des plantes du genre *Euphorbia* provoque des rougeurs sur la peau, des érythèmes ou des phlyctènes. Egaleme nt très irritant pour les yeux, il entraîne par simple contact, même furtif, des larmoiements intenses. A des doses plus élevées, interviennent des lésions graves de l'œil pouvant aller jusqu'à la cécité.

Les troubles de la vue sont accompagnés souvent de toux, de rhinite avec écoulement nasal, de laryngite et de brûlure des lèvres. Une fois absorbé, le latex entraîne des symptômes plus ou moins sévères de gastro-entérite et d'inflammation des muqueuses du tube digestif (Bellakhdar., 1997).

II. Généralités sur les flavonoïdes

II.1. Biosynthèse des flavonoïdes :

Le terme flavonoïdes désigne une large gamme de composés naturels qui appartiennent à la famille des polyphénols (Suvi et al., 2014). Ils sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux. Ce sont des molécules aromatiques poly substituées ayant un rôle de métabolites secondaires, généralement hydrosolubles, et sont responsables des couleurs que l'on observe dans les pétales des fleurs (Smara., 2014). Depuis quelques décennies, les composés polyphénoliques ont suscité un grand intérêt scientifique, à cause de leur importance dans la physiologie des plantes et aussi de leurs rôles dans la pigmentation parce qu'ils sont impliqués dans la croissance et la reproduction des plantes. L'analyse et la compréhension du métabolite phénolique, plus particulièrement celui des flavonoïdes, constituent un réel défi pour un nombre d'équipes scientifiques. (Manach., 2004).

II.1.1. Biosynthèse du squelette C6-C3-C6 :

Les flavonoïdes ont tous la même structure chimique de base, ils possèdent un squelette carboné de quinze atomes de carbones constitué de deux cycles aromatiques (A) et (B) qui sont reliés entre eux par une chaîne en C3 en formant ainsi l'hétérocycle (C) (W- Erdman et al., 2007), généralement, la structure des flavonoïdes est représentée selon le système C6-C3-C6 (Emerenciano et al., 2007) en formant une structure de type diphenyle propane dont des groupements hydroxyles, oxygènes, méthyles, ou des sucres peuvent être attachés sur les noyaux de cette molécule (Narayana., 2001; Malešev et Kuntić., 2007)

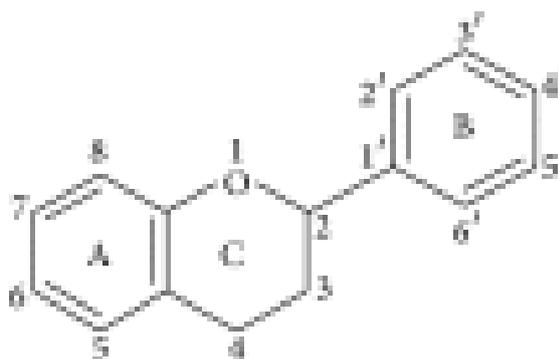


Figure3: squelette de base des flavonoïdes (Di Carlo et al., 1999).

II.1.2. Biosynthèse des différents squelettes flavonoïques :

Les flavonoïdes se divisent en plusieurs sous-classes qui se distinguent par une diversité fonctionnelle au niveau des positions 2, 3 et 4 du cycle C qui permet la division de

flavonoïdes en flavanes, les flavanones, dihydroflavonols, les flavonols, les flavones, tandis que, selon le type, le nombre et la disposition des substituants, les flavonoïdes peuvent être subdivisés en d'autres groupes, tels que les anthocyanidines et chalcones (Smara.,2014).

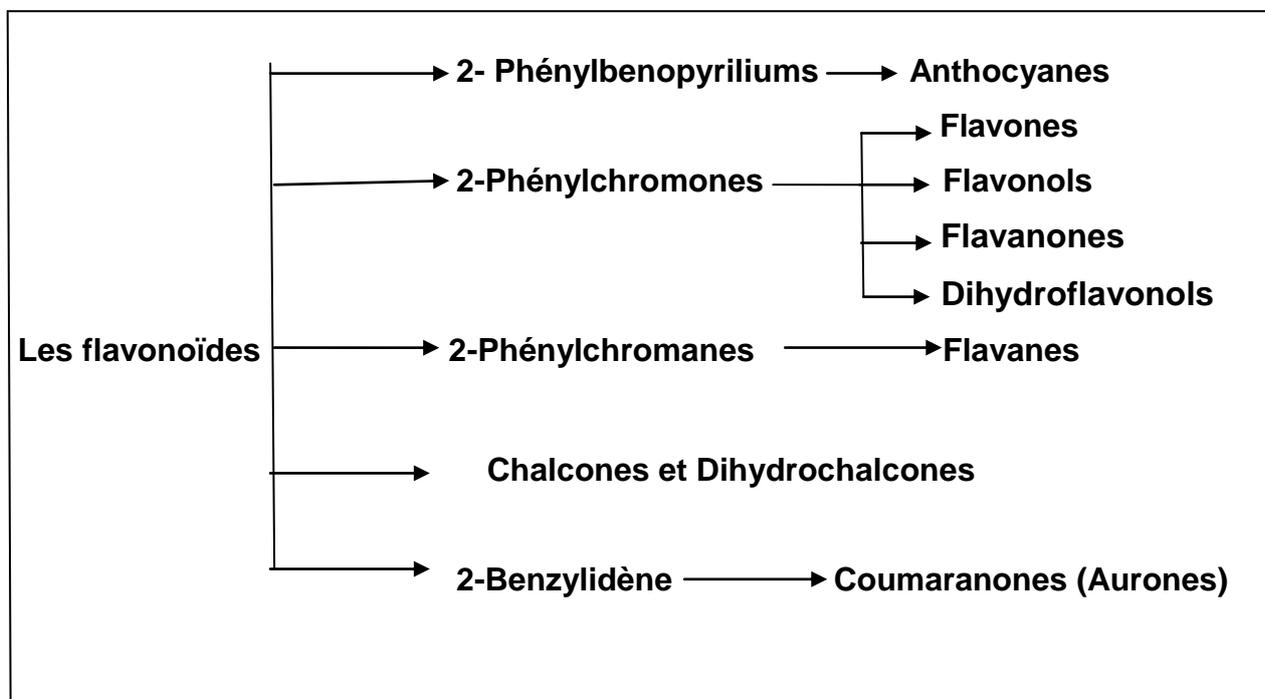


Figure4 : Schéma des sous -classes des flavonoïdes (Smara., 2014) :

II.2.Répartition et localisation des flavonoïdes :

Les flavonoïdes sont impliqués dans de nombreuses interactions des plantes avec les conditions biotiques et abiotiques de leur environnement, ces substances sont accumulées dans différentes parties cellulaires et tissulaires de la plante durant l'organogénèse et sous l'influence de plusieurs facteurs stimulants (Hutzler *et al.*, 1998). Sur le plan cellulaire, les flavonoïdes sont synthétisés dans les chloroplastes puis migrent et se dissolvent dans les vacuoles (Piquemal., 2008), la répartition de ces composés montre des accumulations très localisées, généralement en relation avec une fonction physiologique ou avec l'interaction de la plante avec son environnement. Ainsi, les flavonoïdes qui ont une localisation épidermique ont un rôle d'écran vis-à-vis des rayonnements solaires, tandis que ceux qui sont impliqués dans les mécanismes de défense ont plutôt une localisation sous épidermique (Boudet., 2000) Les flavonoïdes sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs : racines, tiges, feuilles, fruits, graines, bois, pollens (Verhoeyen *et al.*, 2002), ils peuvent aussi être rencontrés dans certains boissons et chez certains fourrages (Urquiaga et Leighton., 2000).

Certaines classes de flavonoïdes sont présentes exclusivement chez certains végétaux, on trouvera par exemple, les flavanones dans les agrumes, les isoflavones dans le soja, les anthocyanes et les flavonols ont eux une large distribution dans les fruits et les légumes.

Tandis que les chalcones se retrouvent plus fréquemment dans les pétales des fleurs, sont considérés comme des pigments naturels au même titre que les chlorophylles et les caroténoïdes (Lahouel., 2005 ; Piquemal., 2008)

II.3. Structure chimique et classification :

❖ Les Chalcones et les aurones :

Le squelette de la chalcone ouvre la voie de la biosynthèse des flavonoïdes, ils sont différents des autres types de flavonoïdes par l'ouverture du noyau central (le cycle C), elles sont constituées par deux unités aromatiques reliées par une chaîne tri carbonée, cétonique, α , β -insaturée, un squelette de 1,3-diphénylpropane C6-C3-C6.

Le noyau B est assez fréquemment monosubstitué ou non substitué, alors que le cycle A est le plus souvent identique à ceux des autres flavonoïdes (C2', C4', C6').

Les aurones sont caractérisées par une structure de 2-benzylidène coumaranone. Pour ces deux types de molécules, la numérotation des positions est différente des autres flavonoïdes (Smara., 2014).



Fig5 : Chalcone et Aurone

❖ Flavones et flavonols :

Tous les types de flavonoïdes dérivent de la 4, 2', 4', 6'- tétrahydroxychalcone et par conséquent, possèdent tous au moins trois hydroxyles phénoliques en C-5, C-7 et C-4', dans plus de 90% des cas, le cycle A des flavones et des flavonols est substitué par deux hydroxyles polyphénoliques en position C-5 et C-7.

Ces hydroxyles peuvent être libres ou étherifiés. Les flavonols se distinguent des flavones par la présence d'un groupement (OH) en position C-3 (Bruneton., 2009).

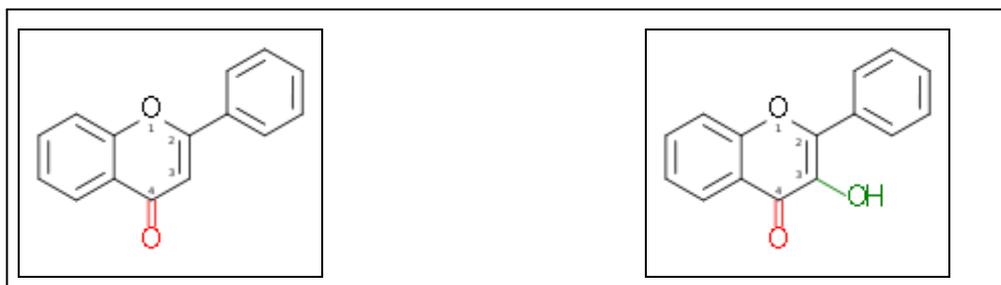


Fig6 : Flavones et Flavonols

❖ Flavanones et dihydroflavonols :

Les flavanones et les dihydroflavonols sont caractérisés par l'absence de la double liaison C₂-C₃ et par la présence de centres d'asymétrie. Les variations structurales sont de même nature que celles décrites pour les flavones et les flavonols.

Les dihydroflavonols ont la même structure que les flavanones, mais ils se distinguent des flavanones par l'hydroxylation de la position C-3 (**Bruneton., 2009 ; Harbone., 1986**).



Fig7 : Dihydroflavonols et Flavanones

❖ Anthocyanes :

La diversité des anthocyanes s'explique par les nombreuses possibilités de substitution des cycles A, B et la nature du sucre en position 3 (C₃). Ils se trouvent dans la nature sous forme hétérosidique ou anthocyanine (**Smara., 2014**).

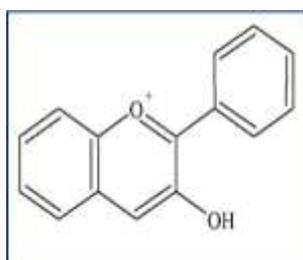


Fig8: Anthocyanes

II.4.Intérêt des flavonoïdes :

II.4.1.Rôle biologique et physiologique :

Ils sont présents dans les feuilles, fleurs, pollen et fruits. Ils constituent de ce fait un écran protecteur contre la photo et la thermo dégradation (protègent la plante contre les agressions des rayonnements UV) (**Sarni-manchado et cheynier ., 2006**).La capacité d'une espèce végétale à résister à l'attaque des insectes et des micro-organismes (bactéries) est souvent corrélée avec la teneur en composés phénoliques (**Bruneton., 1999 ; Jonathan., 1996**).

- Fonctionnent comme des signaux moléculaires de reconnaissance entre les bactéries symbiotiques et les légumineuses afin de faciliter la fixation de l'azote moléculaire.
- Interviennent dans la maturité des fruits.
- Sont à l'origine des goûts amers et astringents afin de repousser les animaux herbivores (**Park et Cha., 2003 ; Subsamanian et al., 2007 ; Yang et al., 2008**).

II.4.2.Rôle thérapeutique :

Les flavonoïdes sont des composés actifs majeurs de nombreuses préparations médicales utilisées depuis des temps très anciens. La médecine moderne utilise de manière croissante les flavonoïdes afin de traiter de nombreuses maladies en utilisant leur capacité à inhiber spécifiquement certaines enzymes, pour stimuler certaines hormones ou neurotransmetteurs, et pour piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles (OH)et superoxyde (O₂⁻) (**Havsteen., 2002**) .Et leurs principale propriété est d'être « veino-actif » c'est-a-dire capable de diminuer la perméabilité des capillaires sanguins et de renforcer leurs résistances .Cette action est appelée vitaminique.(**Ghestem et al.,2011 .,Marouf. , 2007**), ils sont capables d'exercer en plus des propriétés anti-inflammatoires, antiallergiques et antiulcéreuses (**Di Carlo et al., 1999**). l'activité antioxydante attribuée à sa capacité de piéger les radicaux libres, chélater les ions métalliques ou inhiber les systèmes enzymatiques responsables de la formation des radicaux libres (**Jonathan., 2000 ; Harbornes., 2000**), récemment plusieurs études épidémiologiques et ceux réalisées sur différentes lignes cellulaires ont démontré le potentiel anti-tumoral et anticancéreux des flavonoïdes est montré par **Birt et al., 2001** .

Dans le domaine des anti-infectieux, les flavonoïdes ont été signalés comme antibactérien (**Suvi et al., 2014**) , ils sont connus pour être synthétisés par les plantes en réponse à une infection microbienne, donc il ne devrait pas être surprenant qu'ils ont été trouvés *in vitro* comme substances antimicrobiennes efficaces (**Du et al .,2011**).

Les polyphénols et notamment plusieurs flavonoïdes, y compris l'apigénine, la galangine, flavone glycosides et de flavonols, des isoflavones, des chalcones et des flavanones, se sont révélés posséder une activité antibactérienne puissante et sont reconnus par leur toxicité vis-à-vis des microorganismes. Le mécanisme de toxicité peut être lié à l'inhibition des enzymes hydrolytiques (les protéases et les carbohydrolases) ou d'autres interactions pour inactiver les adhésines microbiennes, les protéines de transport et de l'enveloppe cellulaire (Cowan.,1999)

Les flavonoïdes antibactériens peuvent avoir des cibles cellulaires multiples, plutôt qu'un site d'action spécifique, un de leurs actions moléculaires consiste à former des complexes avec des protéines par le biais de forces non spécifiques telles que la liaison hydrogène et les effets hydrophobes, ainsi que par formation d'une liaison covalente. Ainsi, leur mode d'action antimicrobienne peut être liée à leur aptitude à inactiver les adhésines microbiennes, des enzymes, des protéines de transport de l'enveloppe cellulaire, et ainsi de suite. Flavonoïdes étant lipophiles peuvent aussi perturber les membranes microbiennes (Du et al ., 2011).

Les flavonoïdes peuvent aussi empêcher le diabète ou du moins le réduire en inhibant l'enzyme aldose réductase (Chaudhry, 1983).

II.5.Procédés d'extraction des flavonoïdes :

Après la préparation du matériel végétal (broyage), ce dernier est soumis à une extraction pour l'obtention de flavonoïdes, pour se faire, il existe plusieurs méthodes : (Merghem et al ., 1995).

II.5.1.Macération :

La macération consiste à maintenir en contact la poudre végétale avec l'eau potable à une température ambiante pendant une durée de temps en relation avec la substance recherchée. Pour cette méthode, l'eau peut aussi être remplacée par l'alcool, le vin ou l'huile. Ce mode de préparation s'applique tout particulièrement aux drogues mucilagineuses (racines de guimauve, graine de lin, lichen d'Islande), mais aussi lorsqu'il s'agit d'exclure certains constituants indésirables, moins soluble dans l'eau froide (Wichlt et Robert., 2003).

II.5.2. Infusion :

L'infusion consiste à verser sur la drogue de l'eau bouillante et à laisser refroidir. Cette méthode convient aux drogues fragiles et aux drogues riches en huiles essentielles.

Ce procédé s'applique aux feuilles, aux fleurs et aux parties aériennes, mais également à certaines parties corticales et aux racines fragmentées (Wichlt., 2003).

II.5.3.Décoction :

La décoction consiste à maintenir la drogue avec de l'eau potable à ébullition pendant une durée de 15 à 30 min. Ce procédé est particulièrement approprié pour des drogues de consistance dure ou très dure (bois, racines, écorces), en particulier lorsqu'elles renferment des tanins (Wichlt., 2003).

II.5.4.Extraction par solvant volatil :

C'est une méthode d'extraction qui fait appel à un solvant organique. L'extraction est faite dans un extracteur de Soxhlet. Le principe de cette technique repose sur le traitement du matériel végétal avec des solvants en phase liquide ou partiellement vaporisés.

Le corps de l'extracteur contient une cartouche en cellulose remplie de matériel végétal. Cette dernière est fixée sur un réservoir de solvants (le ballon) et surmontée d'un réfrigérant. Le solvant est vaporisé puis condensé tout en restant en contact avec le matériel végétal. La solution collectée dans le ballon s'enrichit de plus en plus en soluté à chaque cycle d'extraction. Le matériel végétal est toujours en contact avec du solvant fraîchement distillé. L'extraction est achevée lorsque les solvants d'extraction deviennent de plus en plus clairs et sans aucune trace de soluté. Elle est fréquemment utilisée pour l'extraction des lipides, ou de diverses autres catégories de molécules. De plus, cette technique d'extraction est récemment combinée aux micro-ondes et aux ultra-sons (Boudjouref., 2011).

II.6.Méthodes de caractérisation des flavonoïdes :

II.6.1.Méthodes chromatographiques :

Les méthodes chromatographiques sont des méthodes d'analyses physico-chimiques qui séparent les constituants d'un mélange par entraînement au moyen d'une phase mobile (liquide ou gaz) le long d'une phase stationnaire (solide ou liquide fixé). Elle se base sur la répartition sélective des solutés entre ces deux phases. Chaque soluté est soumis à des forces de rétention exercées par la phase stationnaire, comme les liaisons hydrogènes, les forces de Van der Waals et une force de mobilité due à la phase mobile. Il en résulte une différence de vitesse de progression des produits et donc d'élution. Ceci permet de les séparer les uns des autres voire de les identifier (Burgot et Burgot., 2006).

Cette vitesse de séparation est fortement dépendante de la nature des phases mobile et stationnaire (Bourguet et Augé., 2008). Il existe plusieurs classifications des chromatographies :

II.6.1.1. La chromatographie sur couche mince CCM:

Le principe de la chromatographie repose sur l'entraînement d'un échantillon dissous par une phase mobile à travers une phase stationnaire (Smara., 2014).

II.6.1.2. Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) :

La chromatographie liquide à haute performance est une technique basée sur les mêmes principes que ceux de la chromatographie classique sur colonne. L'avantage de cette méthode est que les inconvénients rencontrés dans les autres méthodes sont remédiés.

En effet, elle permet une séparation rapide, une présence d'un détecteur et exige une petite quantité d'échantillon à analyser.

Elle est réalisée dans un appareillage plus sophistiqué qui permet de mettre en œuvre, selon la nature de la phase stationnaire, aussi bien des phénomènes de partage, qui sont les plus courants, que des phénomènes d'adsorption, d'échanges d'ions ou d'exclusion (Bourguet et Augé., 2008).

II.6.1.3. Chromatographie en phase gazeuse (CPG) :

La chromatographie en phase gazeuse permet de séparer des mélanges complexes par une série continue d'équilibres, s'établissant entre une phase mobile gazeuse et une phase stationnaire située dans une colonne (Tranchant., 1996). La phase stationnaire peut être liquide (chromatographie gaz-liquide) ou solide (chromatographie gaz-solide). L'échantillon à analyser est introduit à l'état de vapeur dans le gaz vecteur (éluant) qui traverse la colonne. Dans le cas de la chromatographie gaz-liquide, la séparation des constituants du mélange étudié se fait en fonction de leurs coefficients de partage entre le gaz vecteur et le liquide. Un très grand nombre d'échanges s'instaure entre la phase stationnaire et la phase mobile. Comme les coefficients de partage des divers produits sont différents, certains molécules sont d'avantage freinées que d'autres. Les constituants de mélange sont élués de la colonne dans un ordre déterminé, les plus retenues étant élués en dernier (Courtot et Jaussaud., 1990).

II.6.2. La spectrophotométrie :

La spectrophotométrie est une méthode analytique quantitative qui consiste à mesurer l'absorbance ou la densité optique d'une structure chimique donnée en solution. Le principe repose sur l'absorption de la lumière par les espèces chimiques (Zeghad., 2009).

II.6.2.1. Spectres UV-Visible :

Les flavonoïdes peuvent être considérés comme des pigments qui absorbent très fortement les radiations UV, par conséquent la spectroscopie UV-Vis reste l'outil principal pour l'analyse structurale des flavonoïdes (Zeghad., 2009).

II.6.2.2.Spectroscopie Infrarouge(IR) :

La spectroscopie infrarouge permet de déterminer la présence de groupements fonctionnels dans les molécules organiques, et les structures dans certaines molécules simples.

Elle met en jeu l'absorption du rayonnement électromagnétique à des longueurs d'ondes qui s'étend de 2,5 μ m à 15 μ m, en provoquant dans la molécule des mouvements de vibration entre atomes (Mesplede., 2004).

II.6.2. 3 .Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire(RMN) :

La résonance magnétique nucléaire(RMN) est une technique utilisée pour l'analyse des structures de nombreuses molécules chimiques. Elle sert principalement à la détermination structurale des composés organiques. Les principaux noyaux étudiés sont le proton ^1H , le carbone ^{13}C , le phosphore ^{31}P et l'azote ^{15}N . Cette méthode repose essentiellement sur le phénomène de magnétisme. En effet, les noyaux de certains atomes possèdent un moment magnétique nucléaire, c'est-à-dire qu'ils se comportent comme des aimants microscopiques caractérisés par une grandeur quantitative appelée « le spin »(Boudoneu.,1990 ;Canet.,1991) .

II.6.2. 4 .Spectroscopie de masse (SM) :

La spectroscopie de masse est une technique spectrale qui consiste à prendre des atomes ou des molécules individuelles, et à leur faire acquérir une charge, avec ou sans fragmentation. Les molécules sont par la suite triées en phase gazeuse pour donner un spectre en fonction de leur rapport masse /charge (Mendhan et Toullec., 2005). Cette technique peut fournir des informations concernant la composition qualitative et quantitative de mélange complexes, la structure des molécules (inorganique, organique et biologique), et enfin les rapports isotopiques des atomes présents dans les échantillons analysés (Constantin et Schnell.,1996) .

III. Généralités sur les bactéries pathogènes d'origine tellurique

III.1.Principales bactéries pathogène du sol et les infections causées:

Les bactéries, présentent dans presque tous les types de biotopes rencontrés sur terre, sont les organismes les plus ubiquitaires de notre planète. Elles peuvent être isolées du sol, des eaux douces, marines ou saumâtres, de l'air, des profondeurs océaniques, des déchets radioactifs (Fredrickson *et al.*, 2004).

Dans le sol il existe une grande diversité de communautés microbiennes tant du point de vue de la diversité taxonomique que du point de vue des fonctions. En effet, il est estimé, par exemple, qu'un gramme de sol contient environ 10^{10} à 10^{11} bactéries (Horner-Devine *et al.*, 2003), du fait de leur petite taille, leur poids reste inférieur à une tonne par hectare de sol. Ce qui donne aux bactéries une place importante dans Le sol, c'est leur extraordinaire variabilité

biochimique qui leur permet de transformer toutes les substances du sol et de les faire entrer dans le monde vivant (**Claude *et al.*, 2008**).

La plupart des bactéries sont inoffensives pour l'homme, certaines étant même essentielles au bon fonctionnement de l'organisme.

Les êtres vivants sont exposés aux microorganismes pathogènes en ingérant des particules de sol, des fruits ou des légumes mal lavés, une mauvaise hygiène (mains sales), ou une inhalation, lors d'activités en plein air, des particules de sol polluées en suspension ou lors d'une manipulation des matières organiques brutes (lisiers, fientes, fumiers, boues d'épuration urbaine).

Il existe de nombreuses espèces pathogènes à l'origine des maladies infectieuses comme le choléra, la syphilis, la peste, l'anthrax, la tuberculose (**Kumar et Tuteja., 2009, Xu *et al.*, 2010**).

Les maladies provoquées par les microorganismes pathogènes sont surtout de nature digestive. Elles peuvent être bénignes (troubles intestinaux, nausées) ou plus graves (dysenteries).

Les symptômes peuvent apparaître assez rapidement, quelques heures ou quelques jours après le contact, mais de nombreux facteurs interviennent :

- La résistance des microorganismes,
- leur capacité à se multiplier,
- la dose minimale infectante (DMI : quantité minimale de pathogènes absorbée par une personne pour que les symptômes de la maladie se manifestent),
- la réponse de la personne contaminée, qui varie selon l'âge, le sexe et l'état de sante.

Tableau1 : Principales bactéries pathogènes présentes dans le sol et les infections causées :

Bactéries pathogènes du sol	Description	La maladie
<i>Salmonella spp</i>	sont des entérobactéries a Gram-, non sporulée, mobile, anaérobie-facultative, .présente les boues dans l'intestin de l'homme et des animaux, la contamination viens de l'ingestion des œufs et les produits a base d'œufs cru, et la viande de volailles (Narges et al., 2014).	Salmonellose
<i>Clostridium botulinum</i>	Grand bacille (5µm de long, 1µm de large) a Gram+ ,Formant une spore ovalaire terminale déformante (Corpet.,2014).	Botulisme
<i>Listeria spp</i>	Listeria est un petit bacille fin pathogène, Gram plus, mobile, non sporulé, catalase +. Elle résiste bien aux stress physiques (froid, chaud, sel, acide).Germe ubiquiste dans l'environnement, on peut trouver <i>Listeria</i> partout où c'est "sale" dans sol, eau, boues, végétaux mouillés (Corpet.,2014).	Listériose
Campylobacter ;	sont des bactéries spiralées ou incurvée, à Gram- (Corpet.,2014).	Entérite
<i>Brucella</i>	est un très petit coccobacille à Gram négatif, La bactérie est immobile, non encapsulée, non sporulée et aérobie stricte (Garin et al., 2001).	Brucellose
<i>Vibrio cholerae</i>	Bactérie à Gram négatif, producteur	Cholera

	de toxine cholérique (Ramamurthy et al.,2011).	
<i>Bacillus anthracis</i>	bacille à GRAM+ se présente sous la forme d'un bâtonnet épais, aux bouts carrés, immobile, capsulé et capable de former une spore (Michelet).	L'anthrax ou maladie de charbon
<i>Clostridium tetani</i>	Forme végétative : bacilles a bouts carrés en chainettes plus ou moins longues GRAM+. Forme de résistance : spore : dans un environnement favorable permet le développement d'un nouveau <i>Clostridium tetani</i> . Présent dans le sol et les poussières (Sédallian et al., 1999).	Tétanos
<i>Clostridium perfringens</i>	Grand bacille (5µm de long ,1µm de large) a Gram+, Formant une spore ovalaire terminale déformante (Corpet.,2014).	entérites nécrosantes.
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	bacille de Koch, est un bacille aérobie strict, immobile, droit ou légèrement incurvé, de 2 à 5 µm sur 0,3 à 0,5 µm. exigeant des milieux solides et les poussières (HCSP., 2011).	tuberculose (Benjelloun., 2011).
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	est un bacille à Gram- non fermentant,aérobie stricte dont l'habitat est particulièrement étendu. Il s'agit d'un microorganisme saprophyte de l'environnement, notamment au niveau de l'eau, des sols humides et des végétaux. Il est également un commensal de l'homme (Minchella.,2010 et	infections nosocomiales (Faure., 2006).

	Pier.,2005).	
<i>Staphylococcus aureus</i>	cocci à Gram positif, de forme sphérique, avec un diamètre de 0.8 à 1µm. Elles sont regroupés en diplocoques ou en petits amas(grappe de raisin) (Patrick.,1988) .Bactérie immobile non sporulée résistante à une température de 60° (Novick., 1994) caractérisées par une catalase + et une oxydase -.	Méningite (Steven et al.,2004) .

III.2.Les bactéries pathogènes trouvées dans les poulaillers :

Dans un environnement mal entretenu, les poules sont exposées à divers sortes de maladies causées par quelques bactéries se trouvant au niveau de la litière qui est un élément qui sert à recouvrir le sol dans le poulailler. Généralement, elle est destinée à absorber les excréments tout en protégeant les poules du froid et de l'humidité mais cette dernière peut acquérir différentes bactéries pathogènes.

Tableau 2 : bactéries pathogènes présentes dans les poulaillers :

Souches	Description
<i>Staphylococcus aureus</i>	cocci à Gram positif, de forme sphérique, avec un diamètre de 0.8 à 1 µm. Elles sont regroupés en diplocoques ou en petits amas(Patrick.,1988). Bactérie non sporulée résistante à une température de 60° (Novick., 1994).
<i>Pasteurella multocida</i> (Cholera aviaire)	Bactérie relativement sensible dans le milieu externe isolée de la litière dans des élevages (Agabou., 2006).
<i>Mycobacterium spp</i> (Tuberculoses).	sont résistantes a la chaleur (Agabou., 2006).
<i>Haemophilus paragallinarum</i> (Corysa infectieux)	Bactérie fragile et facilement inactivée dans le milieu extérieur (Agabou., 2006).
<i>Erysipelothryx rhusiopathia</i> (Erysipéle)	Résistante a la dessiccation, la fumée (Agabou., 2006).
<i>Escherichia coli</i>	bacille à gram- (Patrick et al ., 1988), de forme non sporulée, de type anaérobie facultative, généralement mobile grâce aux flagelles, sa longueur varie de 2 à 6 µm, alors que sa largeur est de 1,1 à 1,5 µm (Steven et al., 2004).Persiste pour de longues périodes dans les milieux sec (poulaillers) (singer et al ., 2000).
<i>Clostridium perfringens</i> et <i>botulinum</i>	Leurs spores sont très résistantes (Hatheway., 1990).
<i>Chlamydia psittaci</i>	Bactérie fragile elle ne survit que pendant de très courtes périodes (Agabou., 2006).
<i>Campylobacter spp</i>	Sensibles a la chaleur (Chan et all., 2001).
<i>Bordetella avium</i> (Bordetellose)	Dans la litière et en présence de conditions favorables elle peut survivre jusqu'à 6 mois (Agabou., 2006).

III.3. Isolement et identification des bactéries pathogènes du sol :

Les espèces bactériennes peuvent être identifiées en fonction de leurs caractères soit biochimiques ou antigéniques, pathogéniques (classification en pathotype ou pathovars), enzymatiques, de sensibilité aux antibiotiques, de sensibilité aux bactériophages.

D'autres critères se basent sur la composition de la paroi après application du protocole de Gram, la morphologie micro ou macroscopique, la mobilité, la capacité à sporuler, la température de croissance, les besoins nutritionnels, le mode respiratoire, la capacité de photosynthèse, l'utilisation des différentes sources de carbone ou d'azote.

La notion d'espèce bactérienne ne peut être déterminée seulement par l'utilisation de ces critères, mais aussi les propriétés génomiques qui sont principalement le rapport entre les bases guanine, cytosines, adénine et thymine dans la séquence d'ADN et la similarité de séquences d'ADN obtenue par la technique d'hybridation ADN-ADN (Oren.,2004).

III.4. Lutte biologique contre les bactéries pathogènes telluriques :

L'utilisation des antibiotiques conduit dans la très grande majorité des cas à la sélection de populations microbiennes résistantes. Cette résistance est due à des mutations chromosomiques ou à l'acquisition de gènes de résistance portés par des éléments génétiques mobiles (plasmides, phages).

Ces résistances ont conduit à chercher de nouveaux agents antimicrobiens possédant une efficacité plus importante que les drogues synthétiques d'une part et bien acceptés par l'organisme d'autre part (sans exercer des effets délétères sur la santé humaine) (Garcia-Ruiz et al.,2008 ; Kempf et Zeitouni.,2009).

Beaucoup de groupes de recherches ont étudié l'activité antimicrobienne des extraits de plantes médicinales telles que fenouil (*Foeniculum vulgare*), menthe (*Mentha piperita*), thym (*Thymus vulgaris*), ils ont trouvé que ces extraits sont actifs non seulement contre les bactéries mais aussi contre les champignons, les levures et les virus (Jürgen et al., 2009).

D'autres groupes de chercheurs ont franchi une étape plus loin, ils ont isolé et identifié les métabolites responsables de l'activité antimicrobienne des extraits des plantes, cette étape constitue une plateforme pour plusieurs implications incluant l'industrie pharmaceutique, la médecine alternative, et la thérapie naturelle (Huang et al., 2008).



Chapitre II

Le présent travail a pour objectif de réaliser une étude sur l'activité antibactérienne des extraits flavonoïques d'une plante médicinale du genre *Euphorbia*, sur des bactéries pathogènes isolées du sol.

L'expérimentation comporte trois étapes :

- 1- Préparation du broyat à partir de la matière sèche et extraction des flavonoïdes ;
- 2- Isolement et identification des bactéries pathogènes du sol ;
- 3- Evaluation de l'activité antibactérienne de ces extraits sur les bactéries isolées ;

L'expérimentation a été réalisée au niveau du laboratoire VALCOR et le laboratoire de Biologie des Populations et des Organismes de l'université M'Hamed Bougara de Boumerdes et du laboratoire de bactériologie de l'Etablissement Public Hospitalier de M'Chedallah de la wilaya de Bouira.

II-1- Matériel:

II-1-1- Matériel végétal

II-1-1-1- Identification botanique

L'identification botanique du genre a été réalisée au niveau du laboratoire de botanique de l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie (ENSA) d'El-Harrach.

II-1-1-2- Préparation de l'échantillon

Le matériel végétal est constitué de toutes les parties de la plante *Euphorbia* (feuille, fleur, tige, racine). La plante a été cueillie à Ghardaïa en Février 2016. Elle est séchée à température ambiante et à l'abri des rayons solaires, afin de préserver au maximum l'intégrité des molécules. Le matériel végétal séché est broyé grossièrement dans un moulin électrique et la poudre fine obtenue va servir pour la préparation des extraits.

II-1-2- Souches bactériennes

Les souches bactériennes isolées et identifiées sont : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Streptocoque du groupe D*. Elles ont été isolées du sol d'un poulailler au niveau du village Oulad Amboube Elesnam (Bouira) en mois de Décembre 2015, et conservées à 4°C dans des tubes stériles contenant 10 ml de milieu de culture incliné (gélose nutritive) au niveau du laboratoire VALCOR.

II-2- Méthodes

II-2-1-Extraction des flavonoïdes

Nous avons adopté la méthode d'extraction de **Markham (1982)**, avec modification inspirée de la méthode donnée par **Bruneton(1993)**. L'extraction est basée sur le degré de solubilité des flavonoïdes dans les solvants organiques (Fig. 09).

II-2-2- Calcul du rendement

Le rendement désigne la masse de l'extrait déterminée après évaporation du solvant, il est exprimé en pourcentage par rapport à la masse initiale de la plante soumise à l'extraction. Le calcul du rendement en flavonoïdes dans les différents extraits obtenu est fait par la formule suivante :

$$R\% = (M - M_0 / M_T) \times 100$$

Tels que :

R% : taux de la matière extraite ;

M : masse du ballon avec l'extrait ;

M0 : masse du ballon vide ;

MT : masse végétale totale utilisée dans l'extraction ;

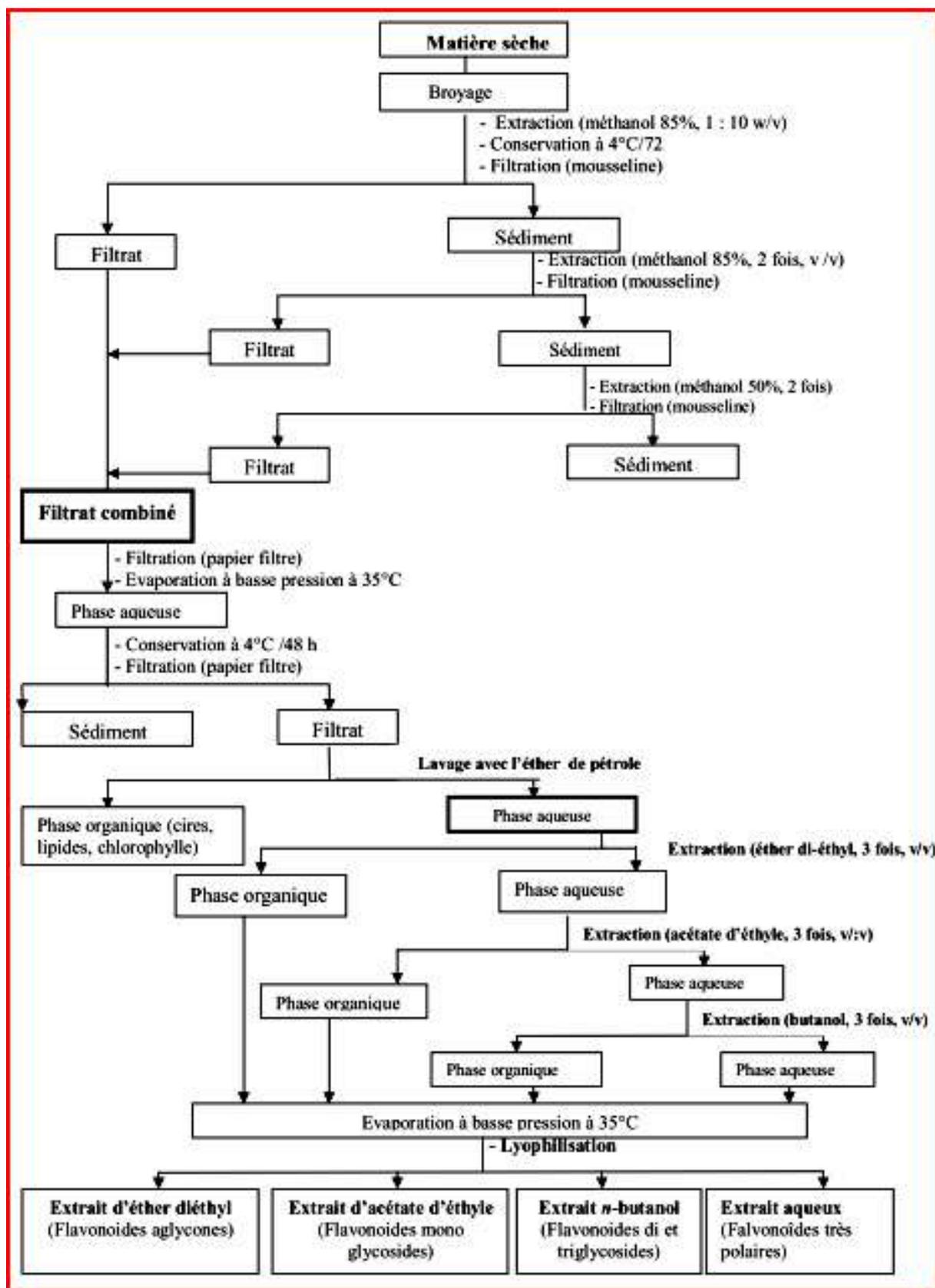


Figure09 : protocole d'extraction des flavonoïdes selon la méthode de (Markham, 1982 modifiée)

II-2-3- Dosage des flavonoïdes par spectromètre

L'évaluation quantitative des flavonoïdes dans les différents extraits d'*Euphorbia* a été réalisée selon la méthode du trichlorure d'aluminium $AlCl_3$ (Kosalec *et al.*, 2004).

Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyde(OH) libre, en position 5 qui est susceptible de donner avec le groupement CO, un complexe coloré avec le chlorure d'aluminium. Ils forment des complexes jaunâtres par des chélation des métaux (fer et aluminium). Ceci traduit le fait que le métal(Al) perd deux électrons pour s'unir a deux atomes d'oxygène de la molécule phénolique agissant comme donneur d'électrons. Pour ce test, 1ml de chaque échantillon est ajouté à 1 ml d' $AlCl_3$ à 2%.Le mélange est vigoureusement agité, et incubé à température ambiante pendant 30 minutes.L'absorbance est lue à 430 nm. La quantification des flavonoïdes se fait en fonction d'une courbe d'étalonnage réalisée par un flavonoïde standard à savoir la quercétine.

Les résultats obtenus sont représentés dans une courbe d'étalonnage, selon l'équation suivante:

$$Y=11,384x+0,1036 \text{ avec } R^2=0,9938$$

La teneur en flavonoïdes est exprimée en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme de poids sec de la plante (mg EQ/g Ps).

II-2-4- Caractérisation des flavonoïdes par Infra-Rouge

La spectroscopie infrarouge repose sur le principe que chaque groupement chimique absorbe la lumière différemment en fonction de sa longueur d'onde. Les zones d'absorption (zone ou la lumière est absorbé) permettent donc d'identifier les groupements fonctionnels (Fontage et Chauchard, 2009).

II-2-5- Isolement des souches bactériennes

II-2-5-1- Prélèvement du sol

Le prélèvement a été réalisé dans un sol de poulailler selon la méthode « zigzag » (Fig. 10).Ainsi, trois échantillons ont été prélevés sur une surface de $1,5m^2$ à 15 cm de profondeur, les échantillons sont mélangés. Afin d'éliminer les grosses molécules telles que les agrégats et les débris, et avoir un sol fin et une solution homogène l'échantillon subit un tamisage (Chaussoud *et al.*, 1992 ; Fardoux *et al.*, 2000).

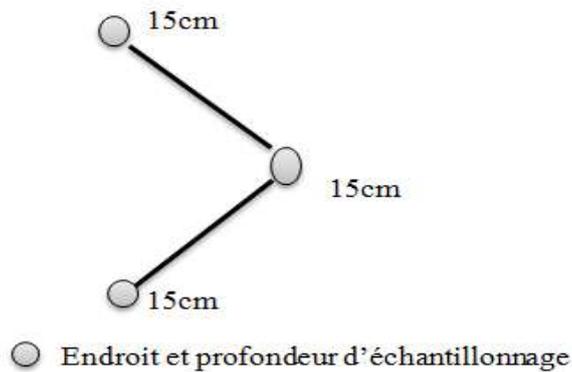


Figure10. Echantillonnage en « zigzag »

II-5-2- Réalisation de la gamme de dilution :

Après avoir réalisé la suspension mère (1g de sol dans 9ml d'eau stérile) (Bettache., 2013), une série de dilutions en cascade de 10^{-1} jusqu'à 10^{-6} à été faite Chaque dilution a été bien homogénéisée par agitation.

II-5-3- Ensemencement

1 ml de chaque dilution a été ensemencé dans une boîte de Pétri contenant de la gélose nutritive, et incubé à 37°C pendant 24h. L'ensemencement a été fait dans des conditions d'asepsie totale.

II-5-4- Identification des souches isolées

II-5-4-1- Examens à l'état frais

Ce test consiste à observer sous microscope optique à grossissement $G \times 40$ un frottis colonie bactérienne sur une lame.

II-5-4-2-Examens macroscopique

Les caractères recherchés après incubation sont : l'aspect de la colonie, la couleur, la forme, la taille, le relief, et la nature de la crème bactérienne.

II-5-4-3- Examens microscopique

L'aspect microscopique de la bactérie est révélé par le biais de la coloration de Gram. Le mode opératoire est le suivant :

- Préparer un frottis à partir d'une colonie bactérienne.
- Colorer au violet de gentiane pendant 1 minute.

- Rincer avec de l'eau distillée et égoutter.
- Ajouter de lugol pendant 1 minute.
- Rincer avec de l'eau distillée et égoutter.
- Ajouter l'alcool 95° pendant 1 minute.
- Rincer avec de l'eau distillée et égoutter.
- Colorer par la fuchine pendant 1 minute.
- Rincer avec de l'eau de robinet et égoutter.
- Observer au microscope optique avec l'ajout d'une goutte de l'huile à immersion (objectif×100).

Lecture : les bactéries à Gram positif gardent la couleur violette du violet de Gentiane quant aux bactéries Gram négatif se décolorent par l'alcool et prennent la couleur rose de la fuschine.

II-5-4-4- Caractères biochimiques

a- Recherche de la catalase

La catalase est une enzyme qui décompose l'eau oxygénée en eau et en oxygène gazeux. Le principe consiste à mettre dans une lame quelques gouttes de H₂O₂ additionnées d'une suspension bactérienne. Le test de la catalase se base sur la recherche d'un dégagement de gaz (Jacques et André., 2004), selon la réaction suivante :



b- Galeries biochimiques classiques

Les galeries d'identification biochimique permettent une identification rapide (parfois en 4 heures) des bactéries (Solbi.,2013):

➤ **Citrate de Simmons (Solbi.,2013):**

Ce milieu permet de mettre en évidence l'utilisation du citrate comme seule source de carbone et d'énergie. Ce caractère est intéressant pour discriminer les bactéries entre-elles et ainsi les identifier. Le substrat ici est le citrate. Il est ici la seule source de carbone et d'énergie pour la bactérie.

Lecture :

La présence de colonies le long de la strie centrale d'ensemencement sera la preuve d'un développement bactérien ce qui traduira le fait que la bactérie est capable d'utiliser le citrate comme seule source de carbone et d'énergie.

➤ Milieu Lactose-Glucose-H₂S (KLIGLER-HAJNA) (Solbi.,2013):

Ce milieu donne quatre réponses en 24 heures maximum :

- 1- Fermentation de lactose.
- 2- Fermentation de glucose.
- 3- La production de H₂S.
- 4- La production du gaz.

Lecture :

- Pour la fermentation de lactose : La surface inclinée vire au jaune. Dans le cas contraire, sa couleur reste inchangée.
- Pour la fermentation de glucose : le culot vire au jaune. Dans le cas contraire, sa couleur reste inchangée.
- S'il y a production de gaz, il est possible d'observer, soit seulement quelques bulles, soit une poche gazeuse qui décolle complètement le milieu du fond du tube.
- Pour la production de H₂S se traduit par un noircissement du milieu dans la zone joignant le culot à la pente. Avec les bactéries donnant peu d'H₂S (*S. Typhi*), le noircissement reste localisé au niveau de la pique.

➤ Milieu mannitol-mobilité-nitrate (Solbi., 2013):

Il s'agit d'un milieu semi-solide contenant entre autre du mannitol, du rouge de phénol comme indicateur de pH, après régénération au bain-marie bouillant pendant 20 min, le milieu est refroidi totalement puis ensemencé par pique centrale.

Lecture :

Lorsque l'indicateur coloré passe du rouge au jaune, ce qui correspond à l'indication du milieu, le mannitol a été utilisé. Le caractère mobile est défini dans ce milieu par un trouble envahissant toute la largeur de la gélose de part et d'autre de la pique centrale, alors qu'une bactérie immobile ne se développe que le long de la pique centrale, le type respiratoire est défini en ajoutant, à la surface du milieu, les réactifs de Griess (acide sulfanilique et alphanaphtylamine), il est possible de mettre en évidence le nitrite, si la bactérie possède une nitrate-réductase.

➤ **Les enzymes : LDC, ODC et ADH (Meziani., 2012) :**

La recherche des décarboxylases de l'ornithine, de la lysine, et de l'arginine forment trois tests biochimiques . Ces trois tests peuvent être réalisés sur les bouillons « LDC- ODC- ADH » qui sont appelés les milieux de Moëller et qui permettent de montrer la présence des décarboxylases et dihydrolase bactériennes par la mise en évidence de l'acidification du milieu et sa réalcalinisation. Lemilieu à la lysine de Taylor est un milieu liquide utilisé pour la recherche de la lysinedécarboxylase.

Lecture :

-Le milieu est bleu-violet.

- Dans le cas contraire, il est jaune.

-En cas de coloration jaune bleuté, poursuivre l'incubation pendant 24 heures supplémentaires.

➤ **Milieu Urée-Indole (Solbi.,2013):**

C'est un milieu liquide utilisé pour la recherche de :

-L'Uréase.

-La production d'indole.

Lecture :

Après incubation :

-on révèle par le réactif Kovacs , pour mettre en évidence la production d'indole.

-alors que l'Uréase est mis en évidence par changement de coloration du milieu.

II-5-5- Sensibilité aux antibiotiques

Dans l'objectif de comparer l'effet de l'extrait et celui des antibiotiques auxquels les bactéries isolées sont sensibles, quelques antibiotiques ont aussi été testés sur ces dernières (Tab. 3).

Tableau 3. Sensibilité des bactéries aux antibiotiques

Souche ATB	<i>Streptococcus</i> <i>spp</i>	<i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i>
Erythromycine	+	+	-
Ciproflaxacine	-	-	+
Clindamycine	+	+	-
Acide nalidixique	-	-	+
Carbénicilline	+	+	+

II-5-6- Evaluation de l'activité antibactérienne

II-5-6-1- Revivification des souches bactériennes

Les bactéries conservées ont été revivifiées par la méthode de stries sur des géloses nutritives, et incubées à 37°C pendant 24h.

II-5-6-2- Repiquage des espèces bactériennes

Les différentes espèces bactériennes ont été repiquées par la méthode de stries sur le milieu Muller Hinton, puis incubées à 37 °C pendant 24h, afin d'obtenir une culture jeune et des colonies isolées qui vont servir à la préparation de l'inoculum.

II-5-6-3- Préparation de l'inoculum

L'inoculum a été préparé à partir de colonies jeunes de bactéries dans de l'eau physiologique stérile (0,9%). Les colonies ont été prélevées à l'aide d'une anse de platine et homogénéisées dans de l'eau physiologique. Il faut noter que pour l'obtention de la suspension 10^8 germes par ml, l'absorbance à 620nm doit être comprise entre 0,2 et 0,3.

II-5-6-4- Préparation des disques

Des disques de papier Whatman de 6 mm de diamètre, stériles (stérilisation à 120°C pendant 15 min par autoclavage), ont été chargés de l'extrait naturel à tester à raison de 5µl par disque.

II-5-6-5- Préparation des milieux de culture

La gélose Muller Hinton stérile prête à l'usage a été coulé dans des boîtes de Pétri stériles de 90 mm de diamètre en raison de 4mm d'épaisseur répartie uniformément dans les boîtes.

II-5-6-6- Ensemencement

Les boîtes de Pétri stériles préalablement préparées, ont étéensemencées par étalage à l'aide d'un râteau stérile, l'ensemencement s'effectue de telle sorte à assurer une distribution homogène des bactéries. À l'aide d'une pince stérile, les disques contenant les produits à tester ont été déposés à la surface de la gélose inoculée au préalable. L'incubation se fait à 37°C pendant 24h.

II-5-6-7- Expression des résultats

La lecture du diamètre de la zone d'inhibition se fait comme suit (**Moreira et al., 2005**):

- non sensible (-) pour un diamètre de 10mm.
- sensible (+) pour un diamètre entre 10 et 14mm.
- très sensible (++) pour un diamètre entre 15 et 19mm.
- extrêmement sensible (+++) pour un diamètre plus de 20 mm.



Chapitre III

I. Extraction:

La préparation des extraits à partir de la plante *Euphorbia sp* a été effectuée par des solvants à polarité croissante (méthanol, éther di éthylique, acétate d'éthyle et butanol), et à ainsi permis d'obtenir quatre extraits ; l'Extrait d'Ether di éthylique, l'Extrait d'Acétate d'Ethyle, l'Extrait Butanolique et l'Extrait Aqueux.

I.1.Rendement:

L'extraction des flavonoïdes par la méthode d'affrontement par les solvants organiques à partir de la poudre de la plante de *Euphorbia sp* montre que l'extrait d'éther di éthylique représente le rendement le plus élevé (6.66%) suivi de l'extrait d'acétate d'éthyle (3,9%) puis l'extrait butanolique(1,96%), et enfin l'extrait aqueux qui possède le plus faible rendement avec (1,7%) (**Tableau 4**).

Il est important de souligner que la méthode utilisée (le choix des solvants), ainsi que les conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée (à chaud ou à froid), affectent le contenu total en flavonoïdes, et par conséquent affecte les activités biologiques relatives à ces métabolites (**Lee et al ., 2003**).

Tableau4: couleur, aspect et rendements massiques de l'extraction:

Phase	Couleur Et aspect	Masse du ballon vide	Masse du ballon avec l'extrait(g)	Masse végétale totale utilisée(g)	Rendement %
Ether di éthylque	Vert foncé (liquide)	189,89	191,88	30	6,66 %
Acétate d'éthyle	Vert clair (liquide)	189,89	191,06	30	3,9 %
Butanolique	Marron (liquide)	189,89	190,47	30	1,96 %
Aqueuse	Marron foncé (caramélisé)	189,89	190,40	30	1,7 %

Le tableau ci-dessus montre que les extraits flavonoïques présentent un aspect soit liquide ou aqueux et une couleur allant du jaune au marron. Le rendement en flavonoïdes varie de 1,7% à 6,66% .

La méthode d'extraction adoptée est basée sur la solubilité différentielle des flavonoïdes dans les solvants organiques. Dans la présente étude, un rendement élevé (6,66%) est obtenu avec l'extrait d'éther di-éthylique d'*Euphorbia sp* contenant les composés phénolique les plus hydrosolubles (flavonoïdes aglycones). Le rendement de l'extrait d'acétate d'éthyle renfermant surtout les mono glycosides est relativement élevé (3,9%), par contre, le rendement de l'extrait butanolique qui renferme certains di et tri glycosides est relativement faible (1,96%), enfin la phase aqueuse riche en flavonoïdes très polaires donne un rendement très faible (1,7%), ces résultats obtenus lors de notre étude semble être différents de ceux obtenus par **Chaabi (2008)** pour *Euphorbia stenoclada baill* récoltée au Madagascar qui est de 13,2% pour la phase aqueuse et ceux de **Soma Oubougoué Brama(2002)** sur *Euphorbia hirta* qui a obtenu environ 3,13% pour la même phase, **Descourtieux et al(1988)** ont également trouvé dans leur étude sur *Euphorbia hirta* récoltée en France un rendement proche de 14% pour la phase aqueuse. **Smara (2014)** a révélé un rendement qui varie de (1%) pour l'extrait d'acétate d'éthyle et 2,6% pour l'extrait butanolique.

Plusieurs travaux ont été effectués sur le genre *Euphorbia*, parmi lesquels ceux de **HABA (2008)** dans ses travaux sur les feuilles de *Euphorbia retusa* Forsk et *Euphorbia guyoniana* (Euphorbiaceae) récolté de la région Biskra (sud-est algérien), rapportant respectivement un rendement de 3% et 4,8% pour l'extrait méthanolique alors que **kemassi (2014)** pour *Euphorbia guyoniana* récoltée de Ghardaïa a trouver un plus faible rendement qui est de 0.082 %, le rendement en flavonoïdes semble dépendre de la nature du biotope et de l'espèce considérée ; sachant que le nombre de lavages effectué dans le protocole d'extraction pourrait conduire a des pertes substantielles des aglycones d'où les inconvénients de la méthode d'affrontement par les solvants.

A fin de mieux concrétisé les rendements obtenus pour les composés flavonoïques les résultats obtenus ont été représenté sous forme d'histogramme (fig11):

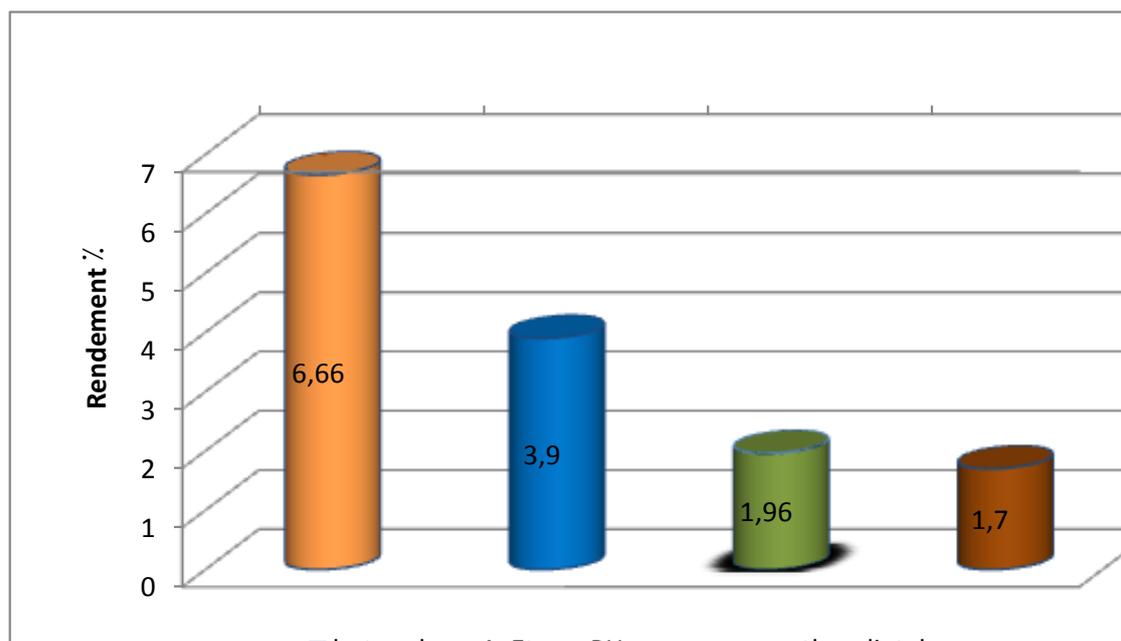


Figure11: rendement en flavonoïdes obtenus pour *Euphorbia sp.*

I.2. Dosage colorimétrique des flavonoïdes :

L'étude quantitative des extraits bruts d'*Euphorbia sp* au moyen des dosages Spectrophotométriques avait pour objectif la détermination de la teneur des flavonoïdes, la raison principale pour le choix de cette substance réside dans le fait que la majorité des propriétés antimicrobiennes des plantes leur sont attribuées.

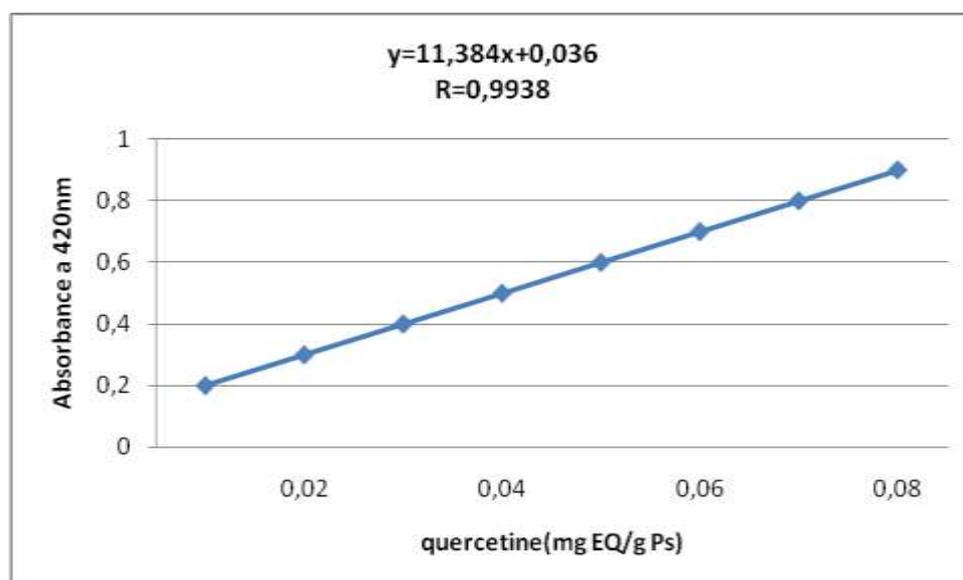


Figure12: courbe étalon de la quercétine (moyenne de 3 essais).

Les valeurs de l'absorbance des 4 extraits a 430nm sont 0,821 pour La phase aqueuse (après dilution), 0,523 pour l'extrait butanolique (dilution), et 0,271 pour celui d'éther diethyle, 0,246 pour celui d'acétate d'éthyle (tableau 5);

Tableau 5: évaluation quantitative en flavonoïdes des extraits d'*Euphorbia sp*

Extrait	Rendement (%)	Absorbance a (420nm)	La concentration (mg EQ/g)
Ether di éthylique	6,66	0,271	0,0147
n-butanol	3,9	0,523	0,247
Acétate d'éthyle	1,96	0,246	0,012
Phase aqueuse	1,7	0,821	0,31

Le tableau ci-dessus montre que l'extrait aqueux renferme environ 0,31 mg EQ/g, qui représente la concentration la plus élevée en flavonoïde cependant **Tsirindiravo (2009)** a trouvé une concentration plus élevée qui est d'environ **0,6339µg/µl** dans son étude sur l'extrait des feuilles de *Dalechampia clematidifolia (euphorbiaceae)* récolté au Madagascar. Suivi de l'extrait butanolique avec une concentration de 0,247 mg EQ/g, puis l'extrait d'éther di éthylique 0,0147 mg EQ/g et enfin celui de l'acétate d'éthyle avec 0,012 (mg EQ/g).

I.3.Analyse par infrarouge(IR):

Les résultats de la caractérisation par infrarouge des extraits obtenus sont représentés dans les figures représenter dans les annexes.

L'interprétation est faite en se basant sur la base de données établit par (**Mabry et al 1970**) :

Tableau 6 : résultats de l'analyse par infrarouge des fractions flavonoïques d'*Euphorbia sp*:

Fraction flavonoïque	Longueur d'onde (Cm ⁻¹)	Liaisons	Nature de la liaison	Fonction
Fraction flavonoïdique aqueuse	3406,58	-OH libre	Bande large	phénol
	1609,47	C=O	Bande moyenne	aldéhyde
	1079,29	C-O	Bande étroite	ester
Fraction d'éther di-éthylique	3441,38	-OH libre	Bande large	phénol
	2924,40	C-H	Bande étroite	alcène
	1071,99	C-O	Bande moyenne	ester
Fraction d'acétate d'éthyle	3419,33	-OH libre	Bande large	Phénol
	2924,55	C-H	Bande étroite	Alcène
	1457,11	CH ₂ , CH ₃	Bande étroite	Alcane
	1207,06	C-H	Bande moyenne	Alcène
	1073,50	C-O	Bande moyenne	Ester
Fraction butanolique	3406,31	-OH libre	Bande large	Phénol
	2925,31	C-H	Bande étroite	Alcène
	1634,39	C=O	Bande moyenne	Aldéhyde
	1072,99	C-O	Bande forte	Ester

Dans l'extrait flavonoïque d'éther di-éthylique d'*Euphorbia sp* la large bande autour de **3441,38** cm⁻¹ est associée à la vibration d'élongation de la liaison OH (de fonction phénol). La bande étroite de **2924,40** cm⁻¹ est généralement associée à la vibration d'élongation de la liaison C-H (de fonction alcène). La moyenne bande localisé à **1071,99** cm⁻¹ correspond à la vibration d'élongation de la liaison C-O (de fonction ester).

Dans l'extrait flavonoïque d'acétate d'éthyle d'*Euphorbia sp*, la large bande autour de **3419,33** cm^{-1} est associée à la vibration d'élongation de la liaison OH (de fonction phénol). Les bandes étroites de **2924,55** et **1457,11** cm^{-1} sont généralement associées à la vibration d'élongation de la liaison C-H et CH₂, CH₃ respectivement (de fonction alcène et alcane). La moyenne bande localisée à **1073,50** cm^{-1} correspond à la vibration d'élongation de la liaison C-O (de fonction ester) et la moyenne bande à **1207,06** cm^{-1} associée à la vibration de déformation de la liaison (-CH).

Dans l'extrait flavonoïque butanolique de *Euphorbia sp* la large bande autour de **3406,31** cm^{-1} est associée à la vibration d'élongation de la liaison OH (de fonction phénol). La moyenne bande localisé à **1634,39** cm^{-1} correspond à la vibration d'élongation de la liaison C=O (fonction aldéhyde). Enfin une faible bande de **2925,31** cm^{-1} est associée à la vibration d'élongation de la liaison C-H (de fonction alcène) et la forte bande autour de **1072,99** cm^{-1} associée à la vibration d'élongation de la liaisons C-O (Ester).

Dans l'extrait flavonoïque aqueux d'*Euphorbia sp* la large bande autour de **3406,58** cm^{-1} est associée à la vibration d'élongation de la liaison OH (de fonction phénol). La moyenne bande localisé a **1609,47** cm^{-2} correspond à la vibration d'élongation de la liaison C=O (fonction aldéhyde). Enfin une faible bande de **1079,29** cm^{-1} est associée à la vibration d'élongation de la liaison C-O (de fonction ester).

Dans l'ensemble les extraits flavonoïques d'*Euphorbia sp* contiennent peu de bandes, ils sont surtout riche en liaisons -OH (de **3441,38** cm^{-1} jusqu'à **3406,31** cm^{-1}) à fonction phénol.

En comparant les différents spectres d'analyse obtenus à partir des fractions flavonoïques d'*Euphorbia sp* on trouve presque les mêmes liaisons et les mêmes longueurs d'ondes, ceci est un indice de pureté des extraits d'*Euphorbia sp*.

II. 1. Identification des souches microbiennes isolées:

Les résultats obtenus lors de l'identification des bactéries isolées sont représentés dans le tableau 07.

Tableau7: Les différents tests réalisés pour l'identification des bactéries isolées :

Petite colonie bombé couleur crème		Petite colonie bombé couleur orange		Colonie en nappe couleur crème		Forme	Aspect macroscopique
1 µm		1 µm		1 µm		Taille	Aspect microscopique
Cocci Immobile		Cocci Immobile		Cocci Immobile		Etat frais	
Gram +		Gram +		Gram +		Coloration de Gram	
Grappe de raisin		Grappe de raisin		Grappe de raisin		Mode de regroupement	
Chapman et la GN		Chapman et la GN		Chapman et la GN		Milieux	Culture
37°C 24H		37°C 24H		37°C 24H		condition	
-	-	-	-	-	-	mob	Test biochimiques
+	+	+	+	+	+	Gaz	
+	+	+	+	+	+	Lac	
+	+	+	+	+	+	Sac	
+	+	+	+	+	+	Urée	
+	+	+	+	+	+	H2S	
/	/	/	/	/	/	CIT	
-	-	-	-	-	-	IND	
+	+	+	+	+	+	ADH	
-	-	-	-	-	-	ODC	
/	/	/	/	/	/	LDC	
+	+	+	+	+	+	Mannitol	
+	+	+	+	+	+	Catalase	
<i>S aureus</i>	<i>S aureus</i>	<i>S aureus</i>	<i>S aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>		

Petite colonie couleur transparente	Petite colonie transparente	Petite colonie Couleur transparente	Petite colonie couleur crème	Petite colonie Couleur transparente	Petite colonie couleur crème	Petite colonie Couleur transparente	Petite colonie couleur crème
2 à 6 µm	2 à 6 µm	2 µm	2 µm	2 µm	2 µm	2 µm	1 µm
Bacille mobile	Bacille mobile	Cocci Immobile	Cocci Immobile	Cocci Immobile	Cocci Immobile	Cocci Immobile	Cocci Immobile
Gram -	Gram -	Gram +	Gram +	Gram +	Gram +	Gram +	Gram +
Isolée	Isolée	En chaînette	En chaînette	En chaînette	En chaînette	En chaînette	Grappe de raisin
GN	GN	Esculine et la GN	Esculine et la GN	Esculine et la GN	Esculine et la GN	Esculine et la GN	Chapman et la GN
37°C 24H	37°C 24H	37°C 24H	37°C 24H	37°C 24H	37°C 24H	37°C 24H	37°C 24H
+	+	-	-	-	-	-	-
+	+	/	/	/	/	/	+
+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	/	/	/	/	/	+
-	-	/	/	/	/	/	+
-	-	/	/	/	/	/	+
-	-	/	/	/	/	/	/
+	+	+	+	+	+	+	-
-	-	+	+	+	+	+	+
+	+	/	/	/	/	/	-
+	+	/	/	/	/	/	/
+	+	+	+	+	+	+	+
/	/	-	-	-	-	-	+
<i>E coli</i>	<i>E coli</i>	<i>Streptocoque D</i>	<i>Streptocoque D</i>	<i>Streptocoque D</i>	<i>Streptocoque D</i>	<i>Streptocoque D</i>	<i>S aureus</i>

Petite colonie couleur transparente	Petite colonie couleur transparente	2 à 6 µm	2 à 6 µm	Bacille mobile	Bacille mobile	Gram -	Gram -	Isolée	Isolée	GN	GN	37°C 24H	37°C 24H	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	/	<i>E coli</i>	<i>E coli</i>
---	---	----------	----------	----------------	----------------	--------	--------	--------	--------	----	----	----------	----------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---------------	---------------

+ : présence

- : absence

II.2. Tests de sensibilité aux antibiotiques :

Afin de mieux évaluer l'effet de l'extrait sur les souches bactériennes isolées nous avons réalisé des tests de sensibilité aux antibiotique de synthèse dans le but de les comparer avec notre extrait ; les diamètres d'inhibition ont été déterminés dans les tableaux 08 et 09.

Les antibiotiques témoins utilisés sont ; l'Erythromycine, la Ciproflaxacine, la Clindamycine, l'Acide Nalidixine et la carbénicilline. La méthode utilisée est celle de diffusion sur disque.

Les résultats de l'antibiogramme appliqué aux différentes bactéries isolées sont représentés dans le tableau 08.

Tableau8 : tests de sensibilité aux antibiotiques

Souches		diamètre d'inhibition par les antibiotiques (mm)				
		E ₁₅	Cl ₂₅	Cip ₅	Cb ₁₀₀	NA ₃₀
<i>E coli</i>	2	12 (S)	16 (S)	41 (S)	13 (S)	27 (S)
	3	38 (S)	12 (S)	42 (S)	32 (S)	27 (S)
	5	20 (S)	16 (S)	42 (S)	24 (S)	26 (S)
	6	38 (S)	25 (S)	40 (S)	8 (S)	28 (S)
<i>S aureus</i>	1	6 (R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)
	7	34 (S)	8 (S)	34 (S)	36 (S)	9 (S)
	8	24 (S)	18 (S)	36 (S)	36 (S)	6 (R)
	10	34 (S)	20 (S)	36 (S)	36 (S)	8 (S)
<i>Streptocoque D</i>	4	6 (R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)
	9	18 (S)	12 (S)	16 (S)	12 (S)	15 (S)
	11	20 (S)	18 (S)	34 (S)	36 (S)	6 (R)
	12	6 (R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)

(S) : sensible

(R) : résiste

II.3. Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'extrait flavonoïques d'*Euphorbia sp*:

La méthode de diffusion sur disque par l'extrait aqueux à permis d'obtenir les résultats mentionnés dans le tableau suivant :

Tableau 9: diamètre d'inhibition de l'extrait d'*Euphorbia sp*

Les souches		diamètre d'inhibition de l'extrait d' <i>Euphorbia sp</i>	Moyenne des diameters (mm)	Surface de la zone en cm ²	Coefficient d'inhibition
<i>E coli</i>	2	28	21,25	35,43	0,35
	3	19			
	5	20			
	6	18			
<i>S aureus</i>	7	21	27	57,22	0,57
	1	28			
	8	27			
	10	32			
<i>Streptocoque D</i>	4	28	26	53,06	0,53
	9	22			
	11	28			
	12	26			

Un coefficient d'inhibition a été calculé, celui-ci varie entre 0,35 pour *E. coli* et 0,53 pour Streptocoque D (fig. 20).

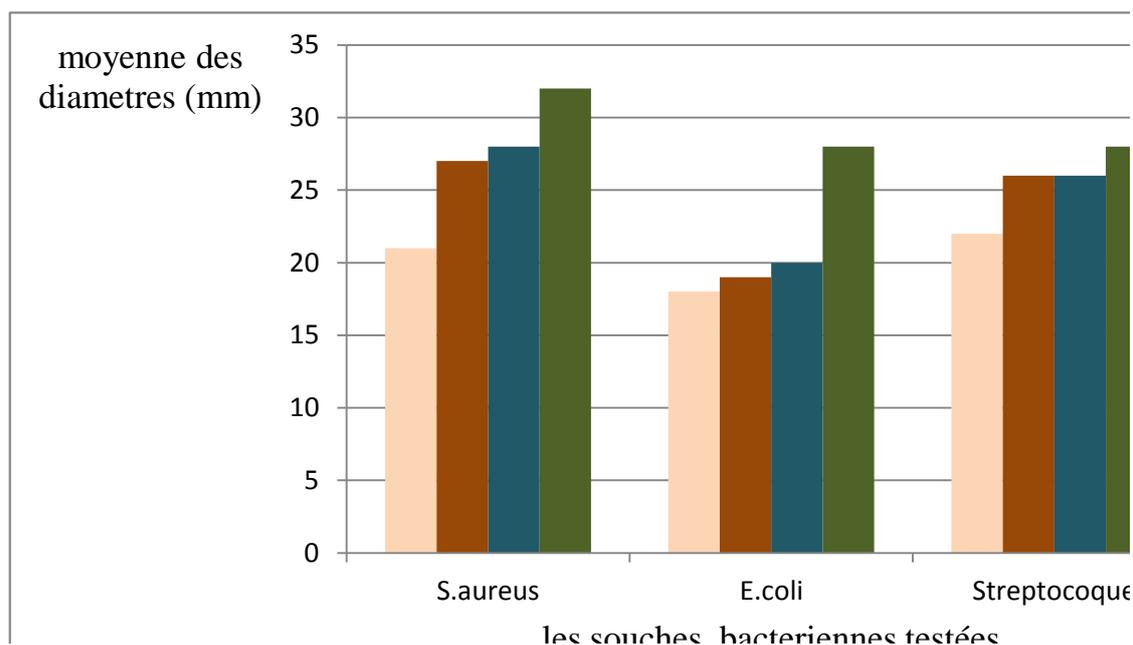


Figure 23: moyennes des diamètres des zones d'inhibitions pour l'extrait flavonoïques.

Ces résultats montrent une activité antibactérienne de l'extrait aqueux de *Euphorbia* sp pour différentes souches des espèces suivantes ; *S.aureus*, *E. coli*, *Streptocoque* D. Le pouvoir antibactérien le plus élevé de l'extrait est observé pour *Staphylococcus aureus* avec une moyenne d'inhibition de 27mm, tandis que pour *E. coli* et les streptocoques elle est respectivement de 21,25mm et 26mm. Dans le même axe et en accord avec nos résultats deux études réalisées par **Soma Oubougoué Brama(2002)** sur *Euphorbia hirta* (Burkina-Faso) et par **Tsirindiravo(2009)** sur une espèce de *Dalechampia* de la famille des Euphorbiaceae ; révèlent que l'extrait flavonoïque de ces deux espèces a une activité antibactérienne sur les bactéries Gram+ et Gram – comme *E. coli* et *S. aureus*.

L'étude de Zellagui *et al* (2012) réalisée sur l'espèce *Euphorbia guyoniana* a été basée sur l'extraction par deux solvants le n-butanol et Méthylène chlorure-Méthanol à différentes concentrations, révèle la présence de zones d'inhibition sur *E. coli* et *S.aureus* où le diamètre diffère selon le type de la bactérie et le solvant utilisé ainsi que sa concentration, ce qui est en accord avec les résultats trouvés dans cette étude.

Staphylococcus aureus:

Pour *Staphylococcus aureus* la moyenne des zones d'inhibition est de 27mm pour l'extrait de *Euphorbia* sp c'est-à-dire quelle est sensible à ce dernier.

La zone d'inhibition d'un bon agent antimicrobien diffère d'un auteur à un autre, d'après **pereira et al (2006)** la zone d'inhibition doit être égale ou supérieure à 10mm, pour **vieira et al (2001)** elle est de 13mm et selon **seokwon kim et al (2006)** elle est supérieure à 6mm.

Dans tous les cas l'extrait végétal de *Euphorbia* sp est un bon agent antibactérien.

La moyenne des diamètres d'inhibition de l'érythromycine est de 24,50mm cela permet de classer *Staphylococcus aureus* dans la classe des microorganismes sensibles, pour la clindamycine la moyenne des diamètres d'inhibition de *Staphylococcus aureus* est de 13mm, cette bactérie est sensible à cet antibiotique, et pour la carbénicilline la moyenne des diamètres d'inhibition est de 28,50mm et pour la Ciproflaxacine est 28 mm donc *Staphylococcus* est sensible à ces antibiotiques. Par ailleurs, la moyenne des diamètres d'inhibition de l'acide nalidixique est de 7mm, la bactérie est donc résistante à cette antibiotique.

***E. coli* :**

Pour *E. coli* la moyenne des diamètres de la zone d'inhibition est de 21,25 mm c'est-à-dire quelle est sensible à l'extrait d'*Euphorbia* sp.

Le diamètre d'inhibition de Ciproflaxacine et l'acide nalidixique est de 41-27mm cela permet de classer *E. coli* dans la classe des microorganismes sensibles pour les deux antibiotiques. La moyenne des diamètres d'inhibition de l'érythromycine, de la clindamycine et de la carbénicilline est respectivement de 27-17-19 mm, la bactérie est donc sensible à ces antibiotiques.

***Streptocoque D* :**

La moyenne des diamètres d'inhibition de l'extrait pour cette bactérie est de 26mm ce qui indique sa sensibilité à l'extrait d'*Euphorbia* sp.

Le diamètre d'inhibition de l'érythromycine, clindamycine, carbénicilline et Ciproflaxacine varie entre 12,5-10,5-15-15,5 mm ce qui permet de laisser *Streptocoque D* dans la classe des microorganismes sensibles pour ces antibiotiques. Pour l'acide nalidixique le diamètre d'inhibition est de 8 mm, ce qui classe la bactérie dans les microorganismes résistants à cet antibiotique.

Le diamètre d'inhibition de l'extrait *Euphorbia sp* est inférieure à celui des antibiotiques pour toutes les bactéries testées, ceci prouve que les antibiotiques ont une activité antibactérienne supérieure à celle de l'extrait ; Cependant les extraits actifs sont des extraits bruts non purifiés alors que les antibiotiques standards sont des molécules pures.

Nous retenons que l'extrait de *Euphorbia sp* est actif sur *Staphylococcus* et *E coli* et streptocoque D .ces germes font partie des principaux germes qui colonisent le sol. Cet étape de fait explique sans doute l'utilisation des Euphorbiacéae dans la médecine traditionnelle **(Singla et Pathak., 1990).**



Conclusion

Conclusion et perspectives

Au cours de ce mémoire, nous avons étudié l'activité antibactérienne d'*Euphorbia* sp.

Malgré son importance biologique et médicinale, cette espèce a été très peu étudiée en Algérie, c'est pourquoi notre étude est destinée à étudier les métabolites secondaires et plus précisément les flavonoïdes de cette plante afin de prouver son intérêt biologique et particulièrement son activité antibactérienne.

L'intérêt de cette étude vient d'une part du fait que les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances bioactives, et d'autre part les effets secondaires induits par les médicaments inquiètent les utilisateurs qui se retournent vers des soins moins agressifs pour l'organisme.

A l'issue de ce travail il apparaît que :

L'extraction des flavonoïdes a permis d'obtenir les rendements suivants : 6,66%, 3,9%, 1,96% et 1,7% est obtenu pour l'éther di éthyle, l'acétate d'éthyle, butanol et à phase aqueuse respectivement pour 30g de la plante sèche.

Le dosage spectral fait à base de la quercétine a indiqué des concentrations considérables en flavonoïdes.

L'analyse par infrarouge des extraits testés a révélé la présence des groupements fonctionnels et des doubles liaisons, et aussi une richesse en liaisons –OH à fonction phénol.

L'étude microbiologique du sol a permis d'identifier 12 souches bactériennes de type : *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Streptocoque D*.

L'activité antibactérienne a été déterminée sur les 12 souches identifiées selon la méthode de diffusion des disques, L'analyse et l'interprétation des résultats de l'effet d'extrait d'*Euphorbia* sp sur la croissance des différentes souches bactériennes testés, nous a permis de conclure que :

-tous les types de bactéries testées sont sensibles à l'extrait d'*Euphorbia* sp.

-le germe le plus sensible est *Staphylococcus aureus* avec une moyenne des diamètres d'inhibition de 27 mm

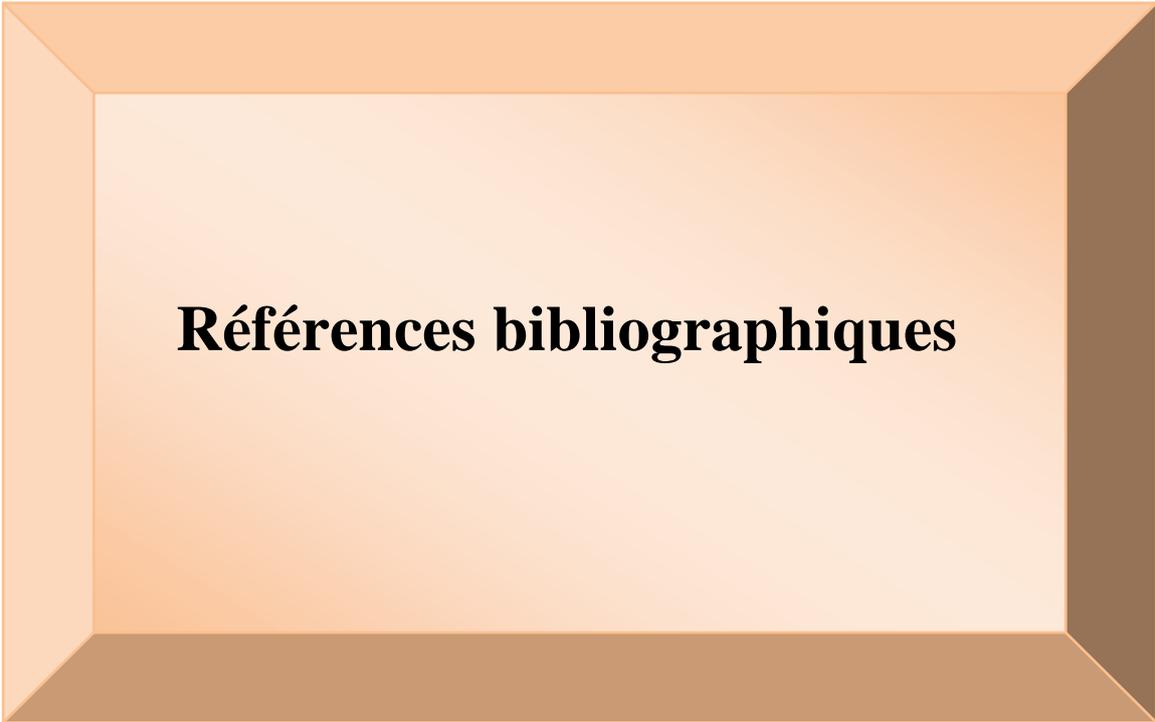
-*Euphorbia* sp est une plante médicinale possédant une activité antibactérienne contre les bactéries à Gram positif et Gram négatif.

L'ensemble de ces résultats obtenus in vitro nous a permis de justifier l'utilisation traditionnelle de cette Plante comme agent antibactérien (**Singla et Pathak., 1990**).

Conclusion et perspectives

Ces résultats ne constituent qu'une première étape dans la recherche de substances d'origine naturelle biologiquement active. En perspective, pour poursuivre ses travaux de recherche portant sur l'effet des molécules actives à action antibactérienne, il est souhaitable:

- Réaliser des tests à différentes concentrations, pour déterminer des doses létales.
- Tester leur efficacité en plein champ, pour obtenir une vue plus approfondie sur les activités antibactériennes des extraits de cette plante.



Références bibliographiques

Références bibliographiques

- **Agabou A., 2006**-Détermination du microbisme en élevage avicole, 15p.
- **Benjelloun M.C., 2011**-La tuberculose. Pathologie respiratoire.
- **Bellakhdar, J., 1997**-La Pharmacopée Marocaine Traditionnelle, Ibis Press.
- **Bettache A ., 2013**-Isolement et sélection d'actinomycètes producteurs d'enzymes cellulolytiques.these de doctorat.32p.
- **Birt D.F., Hendrich S. ET Wang W., 2001**- Dietary agents in cancer prevention, Flavonoïde and isoflavonoïde. Pharmacol. 90(3), 157-177.
- **Bossis, E., Lemanceau, P., Latour, X. and Gardan, L., 2000**-The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. *Agronomie* .20: 51-63.
- **Boudet A. M., 2000**. L'usine chimique. 9^{ème}conférence de l'université de tous les savoirs. France. p1-16.
- **Boudjouref M., 2011**- Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'*Artemisia campestris* L. Mémoire de magister.
- **Boudonneu M ., 1990**-La détection inverse en RMN, analysis, 18(1)
- **Bourguet E.et Augé C., 2008**- Les techniques de laboratoire. Ed. Ellipses, Paris, 151p.
- **Bruneton, J., 2009**.Pharmacognosie- phytochimie, plantes médicinales. 4eme ed.
- **Bruneton, J., 1999**. Pharmacognosie-phytochimie, plantes médicinales.3eme édition.
- **Bruneton J., 1996**.Plantes toxiques : Végétaux dangereux pour l'homme et les animaux. Technique et documentation, Paris.
- **Burgot G. et Burgot J.L., 2006**-Méthodes instrumentales d'analyses chimique et application. Ed.Lavoisier, Paris, 320p.
- **Canet D., 1991**-La RMN; concept et methodes.Ed .Inter, Paris, 274p.
- **Chaabi M., 2008**-Etude phytochimique et biologique d'espèces végétales africaines : *Euphorbia stenoclada* Baill. (Euphorbiaceae),*Anogeissus leiocarpus* Guill. & Perr. (Combretaceae),*Limoniastrum feei* (Girard) Batt. (Plumbaginaceae), thème de doctorat; p29.
- **Chan K F, Tran H L, Kanenaka R Y et Kathariou S., 2001**. Survival of Clinical and Poultry-Derived Isolates of *Campylobacter jejuni* at a low temperature (4°C).

Références bibliographiques

- **Chehema A., 2006-** Catalogue des plantes spontanées du Sahara septentrional algérien. Laboratoire de protection des écosystèmes en zone arides et semi-arides, Univ. Kasdi Merbah, Ouargla, 140 p.
- **Chhabra, S.C. and Mahunnah, R.L.A., 1994.** Plants used in traditional medicine by hayas of the kagera region, Tanzania. *J.Economic Botany*, 84 (2), p: 121-129.
- **Claude et Lydia bourguignon., 2008.** Le sol, la terre et les champignons pour retrouver une agriculture saine. P68-83.
- **Constantin E .et Schnell A ., 1996-**Spectrometrie de masse ,principe et application. Ed .Lavoisir, Paris, 154p.
- **Corpet D., 2014-** risques sanitaires des aliments.bacteries et virus. Dangers Biologiques des Aliments Infections d'origine alimentaire & TIAC.
- **Courtot D et Jaussaud P., 1990-**Le contrôle antidopage chez le cheval. Ed.INRA, Paris 154p.
- **Cowan M M., 1999-**Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*.12 (4): 564-570.
- **Descourtieux PH et Combe A et al., 1988-** Nouvelle utilisation d'Euphorbia Hirta en thérapeutique (anxiolytique), Demande de Brevet d'Invention, laboratoire dolisos(France) ; p3.
- **Di Carlo G., Mascojo N., Izzo a .A. ET Capasso F., 1999-** Flavonoids: olei and new aspects of a class of natural the rapellicdriligs. *Life Sci.*, 65,337-353.
- **Du F, F Zhang et al., 2011-** Du F, Zhang F, Chen F, et al. Advances in microbial heterologous production of flavonoids. *African Journal of Microbiology Research*;5(18):2566–2574
- **Emerenciano V. P., Barbosa K. O., Scotti M. T. et Ferrero M. J. P., 2007-**Self organising maps in chemotaxonomic studies of Asteraceae : a classification of tribes using flavonoid data. *Journal of brazilian chemical society.*, 18 (5) : 891-899.
- **Faure k et al., 2006-**Pseudomonas aeruginosa et surfactant : rôle de SP-A et SPD. *Médecine et maladies infectieuses*. 36 : 63-71.
- **Fredrickson JK, Zachara JM, Balkwill D L, et al., 2004-**Geomicrobiology of high-level nuclear waste-contaminated vadose sediments at the Hanford site, Washington State. *Appl environ microbial*. 70: 4230-4241.
- **Garcia-Ruiz A., Bartolomé B., Martinez-Rodriguez A.J.,Pueyo E., Martin-Alvarez P.J., and Moreno-Arribas M.V., 2008-**Potential of phenolic compounds for controlling lactic acid bacteria growth in wine. *Food Control*.19:835_841.

Références bibliographiques

- **Garin-Bastuji B, Hars J., 2001-** La brucellose du porc et du sanglier en France, état des connaissances au 1^{er} juillet. Rapport ministère de l'agriculture et de la pêche:16p.
- **Haba H., 2008** -Etude phytochimique de deux Euphorbiaceae sahariennes : *Euphorbia guyoniana* Boiss. Et Reut. Et *Euphorbia retusa* Forsk, thème de doctorat, P53-160.
- **Harborne, J. B., 1986**-The flavonoids. Advances in research since.
- **Harboune, J. B., Current Advances in mycorrhizaereseache, G.W. Podila, D.D. Douds (Eds), 2000-** Amercain Phytopathological Society, St Paul, Minnesota, USA. Phytochemistry , 54(7). P: 729-729.
- **Hatheway C.L., 1990** –Toxigenic Clostridia P 66-98.
- **Havsteen, B.H., 2002** - the biochemistry and medical significance of the flavonoids. Pharmacologie et thérapeutique, .96-67-202.
- **HCSP. , 2011**-Tuberculose et tests de détection de l'interféron gamma. Haut Conseil de la Santé Publique.
<http://www.hcsp.fr/explore.cgi/avisrapportsdomaine?clefr=221>.
- **Hernandez T., Canales M., Avila J. G., Duran A., Caballero J., Romo De Vivar A. and Lira R.,2003-** Ethnobotany and antibacterial activity of some plants used in traditional medicine of Zapotitlán De Las Salinas (Mexico); Journal of Ethno pharmacology, vol. 88 (2): 181-188.
- **Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. and Williams, S.T., 1994-** Genus *Pseudomonas*. In: Holt, J.G.; Krieg, N.R.; Sneath, P.H.A.;Staley, J.T.; Williams, S.T. (Eds) Bergey's manual of determinative bacteriology, Williams and Wilkins, pp. 93-94.
- **Horner-Devine M C, Leibold M A, Smith V H and Bohannan B J M., 2003-** Bacterial diversity patterns along a gradient of primary productivity.Ecology Letters. 6: 613-622.
- **Huang Guangrong., Jiang Jiaxin and Dai Dehui., 2008**-Antioxidative and antibacterial activity of the methanol extract of *Artemisia anomaly* S. Moore. *African Journal of Biotechnol.*7 (9): 1335-1338.
- **Hunsa P., Chulabhorn M., Ruchirawat S.,Prawat U.,Tooptakong U., Taylor W,C., Pakawatchai C.,Brian W., Skelton and Allen H., 1995-** White Cyanogenic and non-cyanogenic glycosides from *Manihotesculenta*. Phytochemistry, Vol. 40(4): 1167-1173.

Références bibliographiques

- **Hutzler P., Fishbach R., Heller W., Jungblut T. P., Reuber S., Schmitz R., Veit M., Weissenböck G. et Schnitzler J. P., 1998-** Tissue localization of phenolic compounds in plants by confocal laser scanning microscopy. *Journal of experimental botany*. 49 (323) : 953-965.
- **J.Lhoste., 1989-**santé et pharmacie, le grand livre de la phytothérapie : 11-23-104.
- **Jacques B, and André R. (2004).** Biochimie métabolique Ed ellipses .Paris. pp: 217-219-220-223-225.
- **Jassbi, A. R., 2006-**Chemistry and biological activity of secondary metabolites in *Euphorbia* from Iran. *Phytochemistry*. 67 (18). P: 1977-1984.
- **Jonathan. H., Kelvin D. C., Ian, B, P., Trevor, A. M., Lawrie, J. B., 1996 -** Soybean isoflavonoids and their metabolic products inhibit in vitro lipoprotein oxidation in serum. *Nutritional Biochemistry*.
- **Jonathan, L., 2000 -** Antioxidant *properties of di-tert-butylhydroxylated flavonoids*. *Free Radical Biology and Medicine*, 29(9) P: 900-912.
- **Jürgen R., Paul .S., Ulrike S., and Reinhard S., 2009-**Essential Oils of Aromatic Plants with Antibacterial, Antifungal, Antiviral, and Cytotoxic Properties– an Overview: *Forsch Komplementmed*.16: 79–90.
- **Kemassi A, Boual Z, Ould el hadj-khelil, et al ., 2015 -** Activité biologique de l'extrait d'*Euphorbia guyoniana* (Boiss. & Reut.)(Euphorbiaceae) sur les larves du cinquième stade et sur les adultes de *Schistocercagregaria* (Forskål, 1775) (Orthoptèra-Acrididae), *El Wahat pour les Recherches et les Etudes* Vol.8 n°1 : 44 – 61.
- **Kempf S. Zeitouni., 2009-**Cout biologique de la résistance aux antibiotiques : analyse et conséquences pathologie biologique : article in press.
- **Kosalec I., Bakmaz M., Pepeljnjak S. and Vladimir-Knez EICS (2004) -** Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia. *Acta Pharm*. 54: 65-72.
- **Kumar S ET Tuteja U., 2009 -** Detection of virulence-Associated Genes in Clinical Isolates of *Bacillus anthracis* by Multiplex PCR and DNA Probes. *J Microbiol Biotechnol*. 19:1475-1481.
- **Lahouel M., 2005-**Interaction flavonoides-mitochondrie et rôle de la propolis dans la prévention de l'apoptose induite par certains médicaments anticancéreux. Thèse de doctorat de l'université Mentouri de Constantine.
- **Lee K. W., Kim Y. J., Lee H. J. and Lee C. Y (2003)-**Cocoa Has More Phenolic

Références bibliographiques

- Phytochemicals and a Higher Antioxidant Capacity than Teas and Red Wine. *J. Agric. Food Chem.* **51**: 7292-7295.
- **Li B., Wang X., Chen R., WeiguoHuangfu W. and Xie G., 2008** - Antibacterial activity of chitosan solution against *Xanthomonas* pathogenic bacteria isolated from *Euphorbia pulcherrima*. *Carbohydrate Polymers*, vol. 72: 287–292.
 - **Loïc Girre., 1981**- la médecine par les plantes à travers les âges : 11-109.
 - **Mabry T J., Markham K R., Thomas M B., 1970**- The Systematic Identification of Flavonoids. New York: Springer-Verlag Publication;pp. 261–266.pp. 294
 - **Maire R., 1933**- Études sur la flore et la végétation du Sahara central ; Mémoire de la société d'histoire naturelle de l'Afrique du nord n°3, Mission du Hoggar II, Alger, 361 p.
 - **Manach, C., Scalbert, A., Morand. C., Remesy, C., Jimenez, L., 2004**- Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 79(5). P: 727-747.
 - **Manga, H.M., Brick D., Marie D. E. P., Quetin-Leclercq J., 2004**-In vivo anti-inflammatory activity of *Alchornea cordifolia* (Schumach. & Thonn.) Müll. Arg. (*Euphorbiaceae*).*Journal of Ethnopharmacology.* 92 (2-3), P: 209-214.
 - **Markham K R, Ternai B, Stanley R, Geiger H, Mabry T J. C., 1982**-NMR Studies of FlavonoidsII.*Tetrahedron*; 34:1391–1397.
 - **Marouf A. R. et Reynaud J., 2007**- la botanique : 1962 définitions. Ed Dunod. Paris.
 - **Mavar M. H., Brick D., Marie D. E. P. and Quetin-Leclercq J., 2004**- In vivo anti-inflammatory activity of *Alchorneacordifolia* (Schumach. & Thonn.) (*Euphorbiaceae*); *Journal of Ethno pharmacology* , Vol. 92 (2-3): 209-214.
 - **Mazoir N., Benharref A., Bailen M., Reina M., and Gonzalez-coloma A., 2008**- Bioactive triterpene derivatives from latex of two *Euphorbia* species. *Phytochemistry*, Vol. 69, 1328–1338.
 - **Mendham J. et Toullec J., 2005**-Analyse chimique quantitative de vogel.Ed.De Boeck of Food Science and Technology, 31:68-70.
 - **Merghem R., Jay M., Viricel M. R., Bayet C. et Voirin B., 1995**-Five 8-C benzylated flavonoids from *Thymus hirtus* (*Labiatae*). *Phytochemistry.*, 38 (3) : 637-640.
 - **Mesplede J., 2004**-Chimie organique PC.E9d. Bréal, Rosny-sous-bois, 416p.

Références bibliographiques

- **Mezaache S., 2012**-Localisation des déterminants de la suppression de quelques souches de *Pseudomonas* isolées de la rhizosphère de la pomme de terre. thèse de doctorat.
- **Michelet C-** Anthrax, infections liées a *Bacillus anthracis*, Maladies infectieuses et tropicales renes.
- **Minchella A, Molinari L , Alonso S , Bouziges N, Sotto A , Lavigne J P ., 2010**- Evolution of antimicrobials resistance against *Pseudomonas aeruginosa* in a French University Hospital between 2002 and 2006, Pathologie Biologie 58;p.1-6.
- **Narayana K. R., Reddy M. S., Chaluvadi M. R. et Krishna D. R., 2001**- Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. Indian journal of Pharmacology., 33 : 2-16.
- **Narges Cheraghchi, Pejvak Kaki et al.,2014**-Identification de isolé *Salmonella enterica* sérotype *gallinarum* biotype *Pullorum* et *Gallinarum* par PCR-RFLP ;7 (9): e19 ,135.
- **Nazaré D. M. M., Sebastiao F. Palmeira J., Conserva L. M. and Lyralemos R.P., 2005**-Quinoline alkaloids from *Sebastianiacorniculata* (Euphorbiaceae). Biochemical Systematics and Ecology, Vol. 33 (5): 555-558.
- **Novick R.P., 1994**-Staphylococci.P 539-550.
- **Oren A., 2004**-Prokaryote diversity and taxonomy: current status and future challenges. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 359: 623-638.
- **Ozanda P., 1991**- Flore et végétation du Sahara ; (3ème édition, augmentée). Ed. CNRS, Paris: 662 p.
- **Park H. J. et Cha H. C., 2003**-Flavonoids from leaves and exocarps of the grape Kyoho. Korean journal of biological society. 7: 327-330.
- **Patrick B., Jean L., and Michel S., 1988**-Bactériologie : Les bactéries des infections humaines. 1^{er} Ed Médecine –Sciences Flammarion. Paris. pp: 100-108-274.
- **Pereira S et al., 2006**- antimicrobial activity of *indigofera suffruticosa*.
- **Pier G, Ramphal R ., 2005**-*Pseudomonas aeruginosa*.
- **Piquemal G., 2008**-Les flavonoïdes (en ligne) : http://www.detoursante.com/index.php?Option=com_content&view=article&id=166&Itemid=215'.

Références bibliographiques

- **Place N. Veziris, A. Aubry, W. Sougakoff, C. Truffot-Pernot, V. Jarlier., 2004-** Des outils moléculaires dans le diagnostic, Le traitement et L'épidémiologie des infections à Mycobactéries *Med Trop*; 64 : 243-250.
- **Quenzel, P., Santa, S., 1963-** Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. In : CNRS (Ed.), Vol. 1-2. Paris.
- **Ramamurthy T, Bhattacharya S K., 2011-**editors. Epidemiological and molecular aspects on Cholera. Humana Press. Springer.
- **Rouessac F, Rouessac A., 1998** -« Analyse Chimique. Méthodes et Techniques Instrumentales Modernes. Cours et Exercices Résolus » 4^{ème} Ed.; Dunod, Paris.
- **Sarni-Manchado.p.et V. Cheynier., 2006-** les polyphénols en agroalimentaires. Suisse Agri, 39(2), 94p.
- **Sédallian A et al., 1999-** Actualités sur les infections mixtes. La Lettre de l'Infectiologue - Tome XIV - n° 2.
- **Seokwon kim et al., 2006-** antibacterial and antifugal activity of sulfur-containing compounds from *petiveria alliacea* L.
- **Singer R.S, Jeffrey J.S, Carpenter T.E, Cooke C.L, Atwill E.R, Johnson W.O, Hirsh D.C., 2000-**Persistence of cellulitis-associated *Escherichia coli* DNA fingerprints in successive broiler chicken flocks.
- **Singla, A.K., Pathak, K., 1990-**Phytoconstituents of *Euphorbia* species. Fitoterapia LXI (6) P: 483-516.
- **Smara O., 2014** - étude ethnobotanique et chimique d'*Euphorbia guyoniana* boiss.et Reut. thèse de doctorat de l'université Badji Mokhtar d'Annaba.29.
- **Solbi S., 2013-**Effet du repiquage de *Pseudomonas aeruginosa* sur les caractères morphologiques, biochimiques et sensibilité aux antibiotiques. thèse de doctorat.
- **Soma Oubougoué Brama., 2002-** Activité antibactérienne d'extraits d'*Euphorbia hirta* (Linn), une plante utilisée traditionnellement dans le traitement des infections urinaires. Thèse de doctorat.
- **Spichigera R E., Savolainene V V., Figeat M., 2000-** Botanique systématique des plantes à fleurs. Ed. Presse polytechniques et universitaires Romandes, Lausanne.
- **Steven. P., Rachel. C., Martha. E., Paul. H., Jane. S., and Peter W.J., 2004-** Microbiology of Waterborne Diseases. Ed Elsevier Academic Press. Pp71-132.
- **Subsamanian S., Stacey G. et Yu O., 2007-**Distinct crucial roles of flavonoids during legume nodulation. Trends in plant science. 12 (7): 282-283.

Références bibliographiques

- **Suvi M et al., 2014**-Exploration systématique des flavonoïdes naturels et synthétiques pour l'inhibition de *Staphylococcus aureus* bio films.
- **Tranchant J., 1996**- Chromatographie en phase gazeuse. Techniques de l'ingénieur, traie de Génie des procédés .PE 1485.27p.
- **Tripathi R D and Tiwarik P., 1980**-Genticulatin, a triterpenoidsaponin from *Euphorbiageniculata*.Phytochemistry, Vol. 19 (10): 2163-2166.
- **Tsirindiravo L et Andrianarisoa B., 2009**- Activités antibactériennes de l'extrait des feuilles de *Dalechampia clematidifolia* (Euphorbiaceae) ; p1.
- **Urquiaga I. et Leighton F., 2000**-Plant polyphénols antioxydants and oxidative stress. *Biological Research*. 33 (2): 55-64.
- **Verhoeven M. E., Bovy A., Collins G., Muir S., Robinson S., De Vos C. H. R. et Colliver S., 2002**-Increasing antioxidant levels in tomatoes through modification of the falconoid biosynthesis pathway. *Journal of experimental botany*. **53** (377): 209 - 210.
- **Vieira et al ., 2001**- microbiocidal effect of medicinal plant extracts upon bacteria isolates from fish muscle and known to induce diarrhea in children.
- **W –Erdman J., Balentine J. D., Arab L., Beecher G., Dwyer J. T., Folts J., Harnly.,Hollman J. P., L Keen C., Mazza G., Messina M., Scalbert A., Vita J., WilliamsonG.et Burrowes J., 2007**-Flavonoids and heart health : Proceeding of the ILSI North America flavonoids workshop, may 31-june 1, 2005, Washington. *Journal of Nutrition*. 137 (3 supp1): 718-737p.
- **Wichtl M. et Anton R., 2003**-plantes thérapeutiques, Ed .Tec et Doc, Paris ,689p .
- **Xu X, Stern A, Liu Z, Kan B ET Zhu J., 2010**-Virulence regulator AphB enhances toxR transcription in *Vibrio cholera*. *BMC Microbiology*. 10:3.
- **Yang R. Y., Lin S. et Kuo G., 2008**-Content and distribution of flavonoids among 91 edibles plant species. *Asia of pacific journal of clinical nutrition*. 17 (S1): 275-279.
- **Zeghad Nadia., 2009**-Etude du contenu poly phénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne .thèse de magister (Ecole doctorale). Université Mentouri Constantine.
- **Zellagui A .Noamane S et al., 2012**- phytochemical screening of five Algerian plants and the assessment of the antibacterial activity of two euphorbia guyoniana extracts, *Der Pharmacia Lettre*, 4(5):1438-1444.

Références bibliographiques

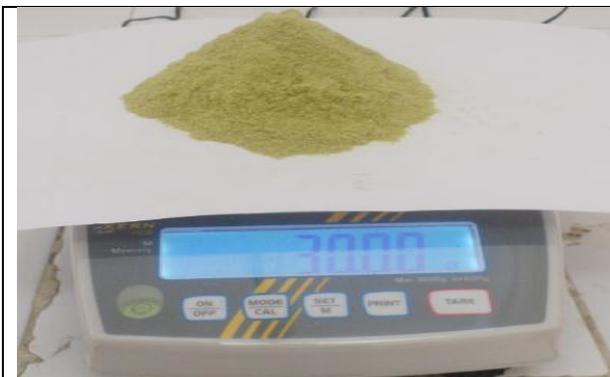


Annexes

Annexe I

Appareillage et matériel utilisés durant l'étude :

➤ Equipements et appareils



La balance



Rotavapor



Microscope optique



L'infrarouge



L'étuve

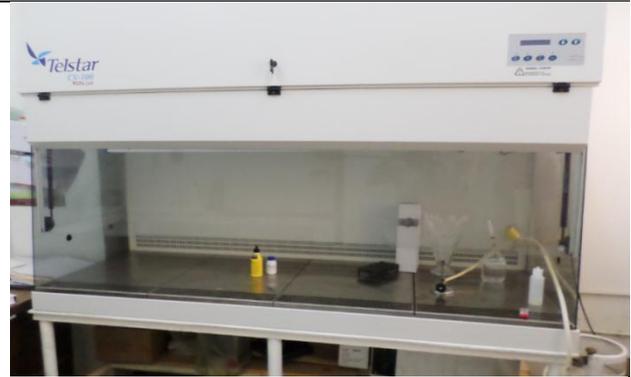


Bec benzène

Annexe I



Réfrigérateur



La Haute

➤ Verreries et petits matériels :

- Ampoule a décanté
- Béchers
- Boîtes pétries
- Cuvettes de spectrophotomètre
- Disques d'antibiogrammes vierges
- Disques d'antibiotiques
- Ecouvillons
- Entonnoirs
- Eprouvettes graduées
- Flacons stériles
- Lames et lamelles
- Micropipette
- Mousseline
- Papier filtre
- Parier wattman
- Pioche
- Pipettes pasteurs
- Sachet en plastique stérile
- Spatule
- Tubes à essais

➤ Réactifs et milieux de cultures :

- Acétate d'éthyle($C_3H_6O_2$)
- Alcool
- Eau distillée
- Eau oxygénée
- Eau physiologique
- Ether di éthylique

Annexe I

- Ether de pétrole (CH₃-(CH₂)_n-CH₃)
- Fuschine
- Huile de vaseline
- Kovacs
- Lugol
- Méthanol(CH₃OH)
- Milieu Chapman
- Milieu citrate de Simmons
- Milieu mannitol-mobilité
- Milieu urée-indole
- n-butanol
- trichlorure d'aluminium a 2%.(AlCl₃)

Annexe II

Compositions des milieux de culture :

Gélose nutritive :

-peptone trypsique	15g
-agar.....	15g
-extrait de viande.....	1g
-extrait de levure.....	2g
-NaCl.....	5g
-Eau distillée.....	1000ml
-Ph = 7,2	
-Repartir dans des flacons stériles	
-Autoclaver a 120°C pendant 20min (BOUCHIOUANE A ., 2004)	

Gélose Muller Hinton :

-infusé de bœuf.....	300ml
-peptone de caséine.....	17,5g
-agar.....	17g
-Eau distillée.....	(1litre pour 38g du mélange)
-Ph=7,4(BOUCHIOUANE A ., 2004)	

Milieu Chapman :

-peptone trypsique de caséine.....	2g
-Extrait de viande	1g
-Protease peptone n 3	9g
-NaCl.....	75g
-Mannitol.....	10g
-Agar.....	15g
-Rouge de phenol.....	0,025g
-Eau distillée.....	1000ml
-Ph=7,5	
-Autoclaver a 121°C pendant 20min	

Annexe II

-C'est un milieu qui permet la culture des bactéries halophiles *Staphylococcus* et pour leur identification (BOUCHIOUANE A ., 2004).

Esculine (Esc) :

Préparation :

- Peptone2 g
- Citrate de fer ammoniacal.....0.2 g a pH=7.4
- Esculine.....0.2 g
- Eau distillée100 ml

Stérilisation 110°, 30 mn

Annexes III

Milieux d'identifications :

Citrate de Simmons :

Il est utilisé pour mettre en évidence la possibilité pour une bactérie de se cultiver en présence de carbone.

-chlorure de sodium.....	5g
-sulfate de magnésium 7H ₂ O.....	0,2g
-phosphate di potassique PO ₄ H ₂	2g
-citrate trisodique.....	2g
-solution bleu de bromothymol 1%.....	8ml
-agar.....	15g
-eau distillée.....	1000ml
-ph=7	

-ce milieu est reparti en tube de 16x160 à raison de 7ml par tube.

-Autoclaver a 115°C pendant 30min.

-Incliner au moment de l'emploi de telle sorte que la pente fasse toute la hauteur de tube

(BOUCHIOUANE A ., 2004).

Mannitol-mobilité :

-Peptone pancréatique de viande.....	2g
-Agar.....	4g
-Mannitol	2g
-Nitrate de potassium.....	1g
-Rouge de phénol solution a 1%.....	4ml
-Eau distillée.....	1000ml

-Dissoudre les ingrédients en chauffant jusqu'à l'ébullition, puis on ajuste le ph à 7,2

(BOUCHIOUANE A ., 2004).

Annexes III

Urée-indole :

-Tryptophane.....	3g
-Phosphate mono potassique.....	1g
-Phosphate di potassique	1g
-Chlorure de sodium.....	5g
-Urée.....	20g
-Alcool a 95°	
-Solution de rouge de phénol a 1%.....	2,5ml
-Eau distillée.....	1000ml

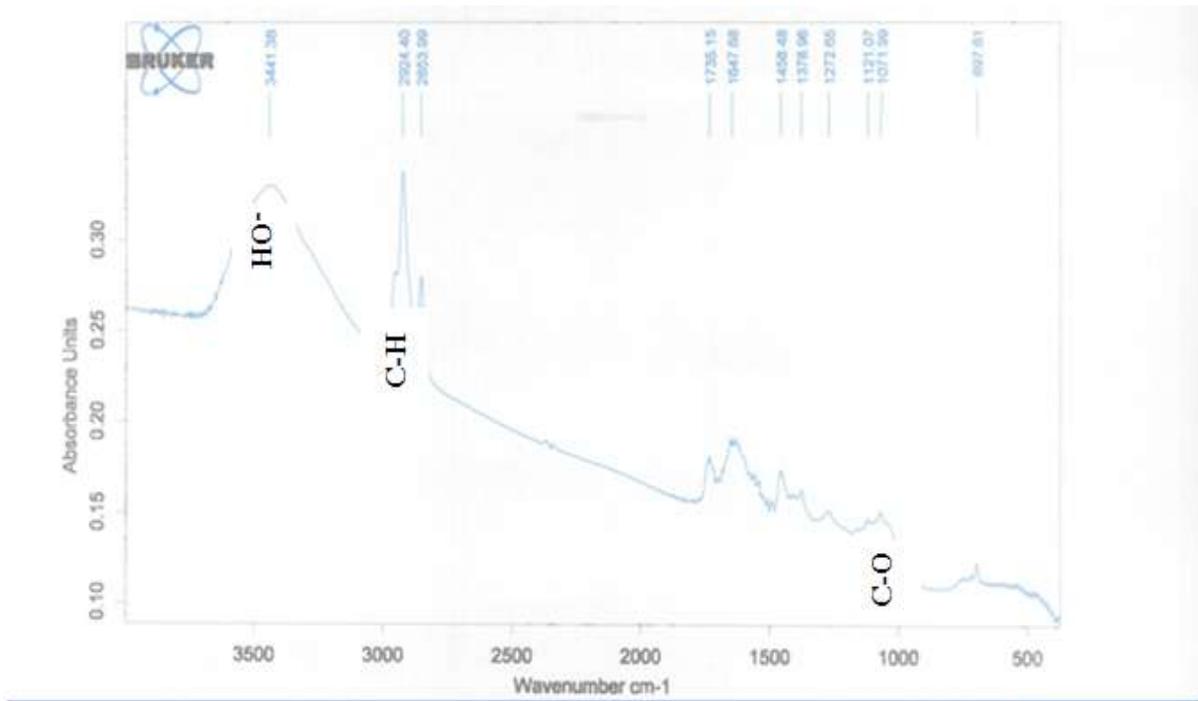
-Stériliser par filtration

-Repartir à raison de 15 ml par tube de stoker

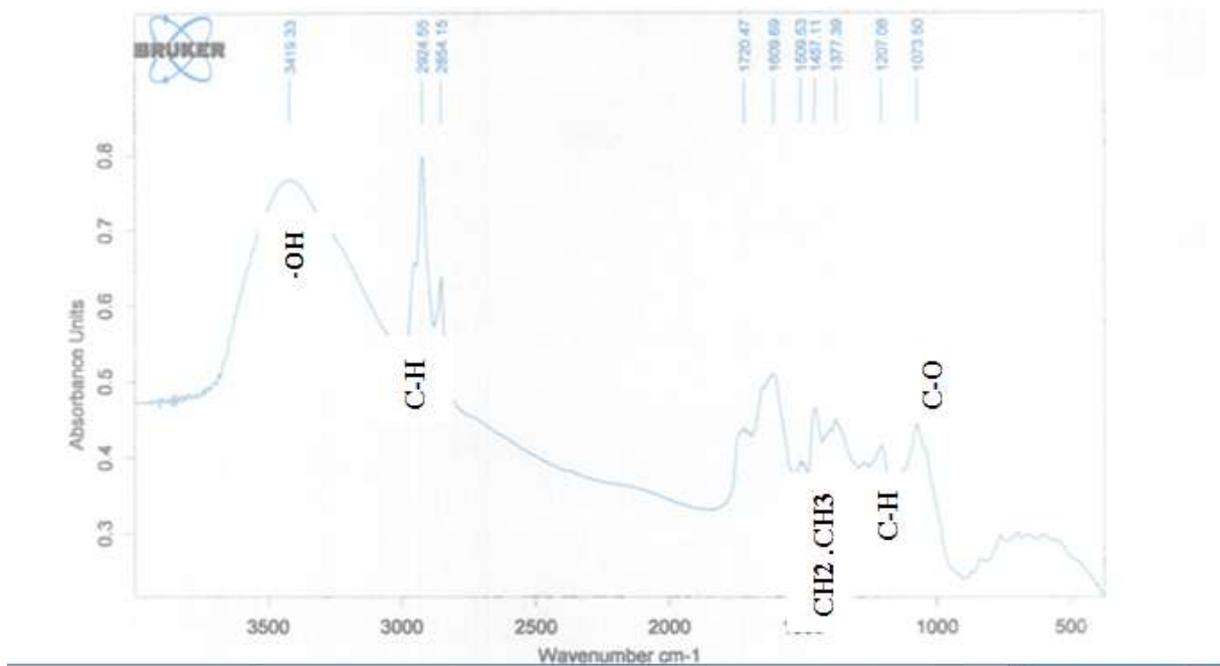
-Au moment de l'emploi, reparti stérilement le contenu d'un tube dans des tubes a hémolyse, chacun de ce dernier contenant 1ml.

-Sur ce milieu, il est possible d'effectuer 3 recherches :

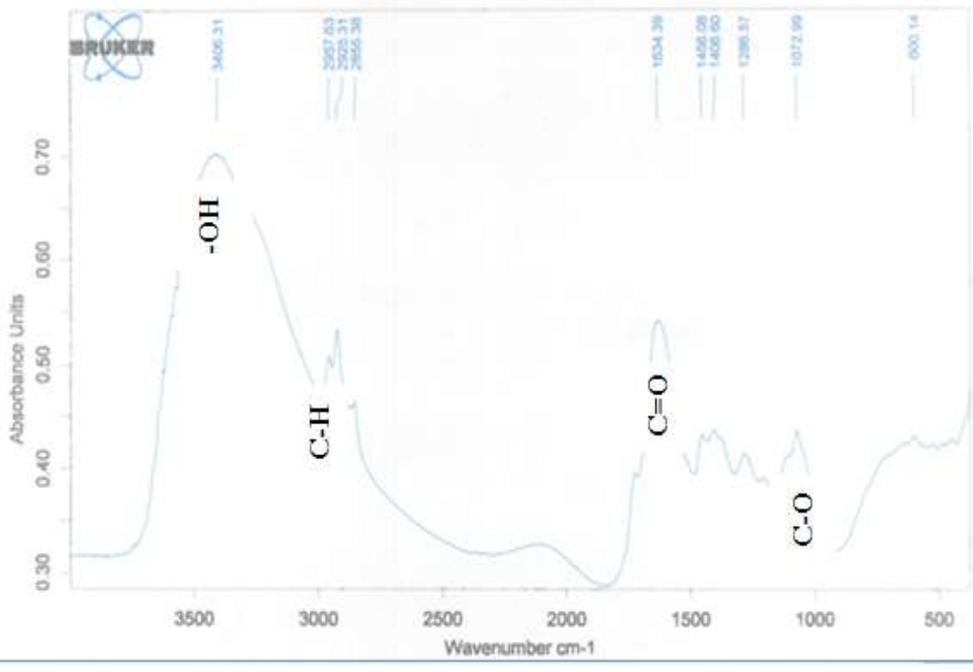
- Présence d'une urease.
- Présence d'une tryptophane désaminase TDA.
- Production d'idole (**BOUCHIOUANE A ., 2004**).



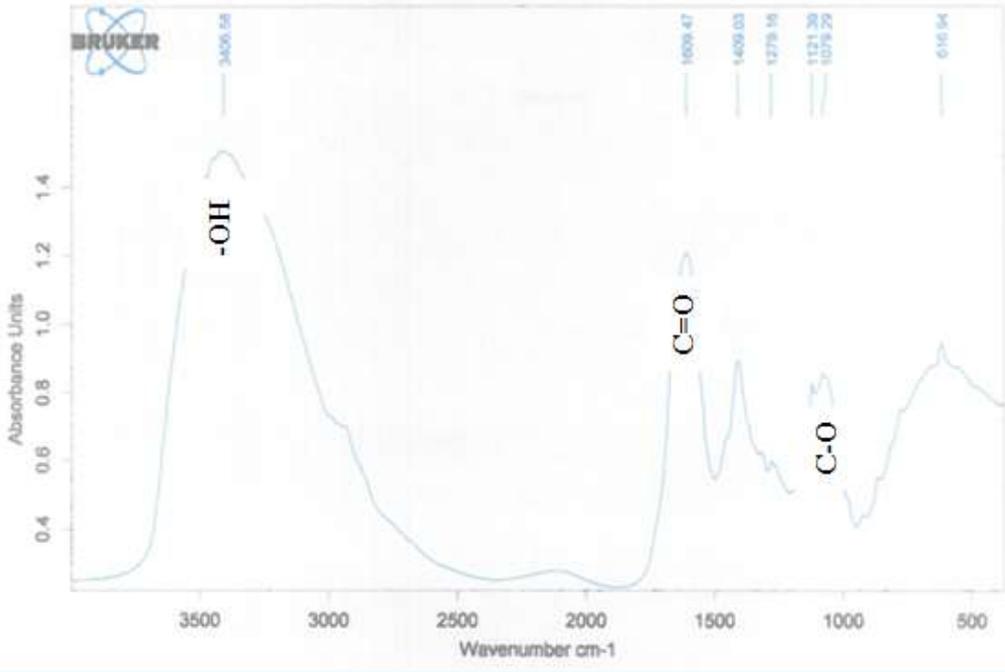
Chromatogramme de l'extrait éther di éthylique d'Euphorbia sp.



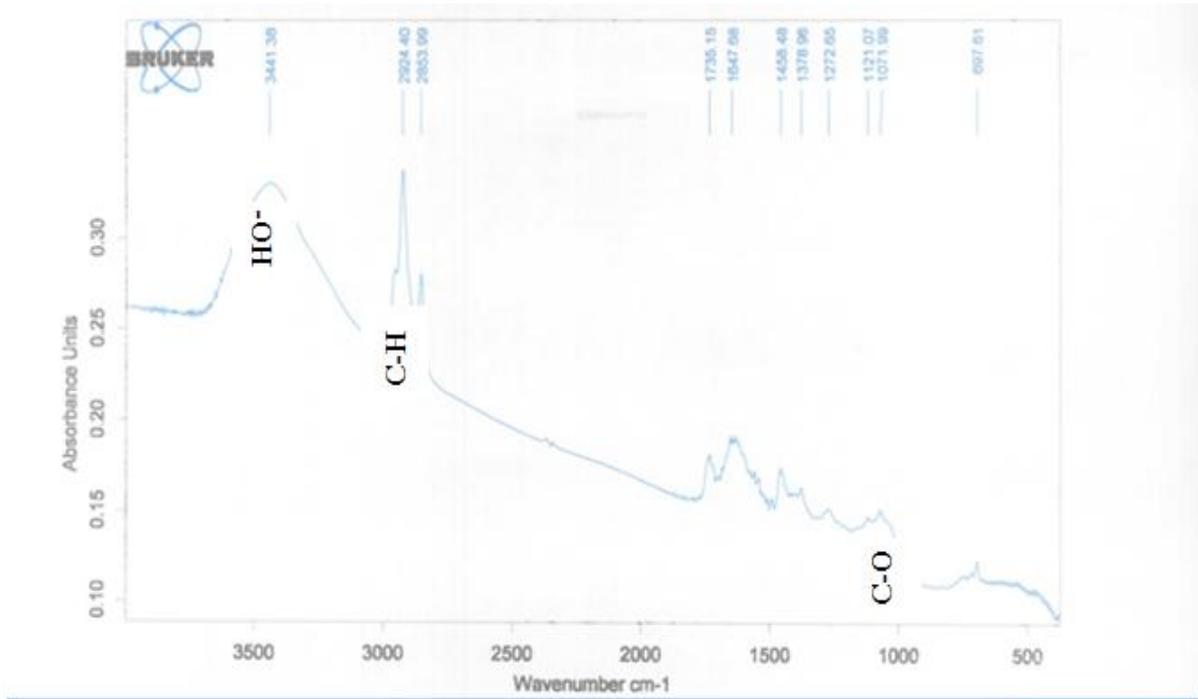
Chromatogramme de l'extrait acétate d'éthyle d'Euphorbia sp.



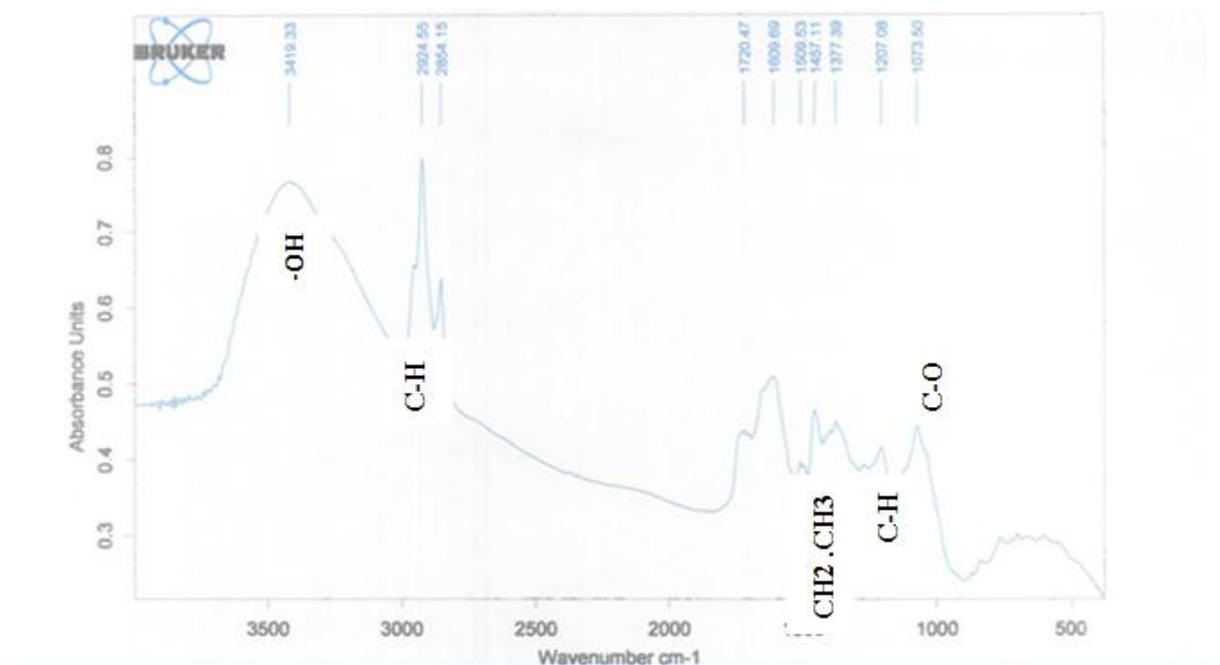
Chromatogramme de l'extrait butanolique d'*Euphorbia sp*



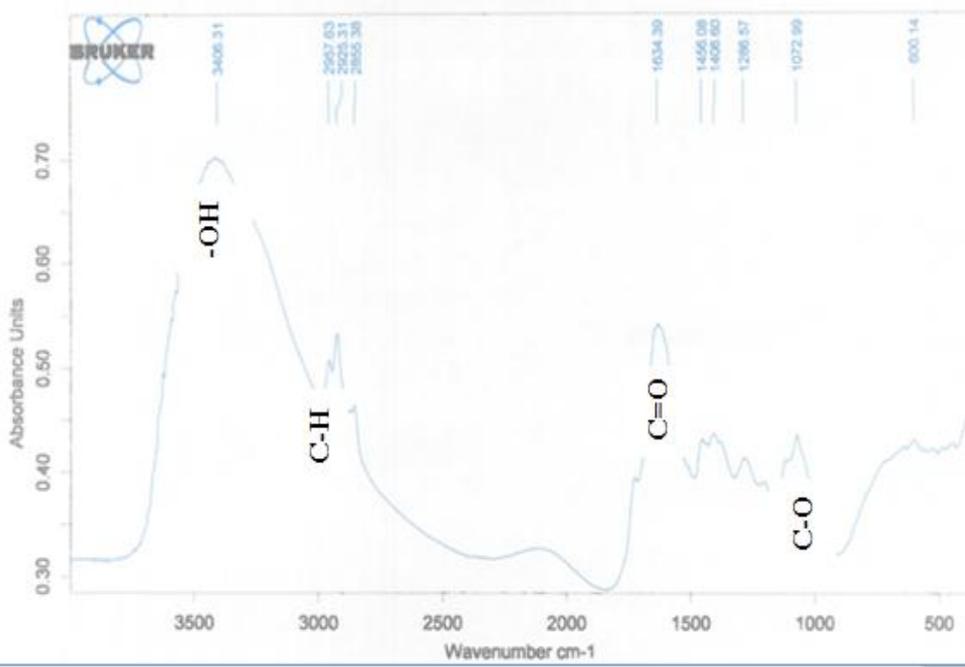
Chromatogramme de l'extrait aqueux d'*Euphorbia sp*.



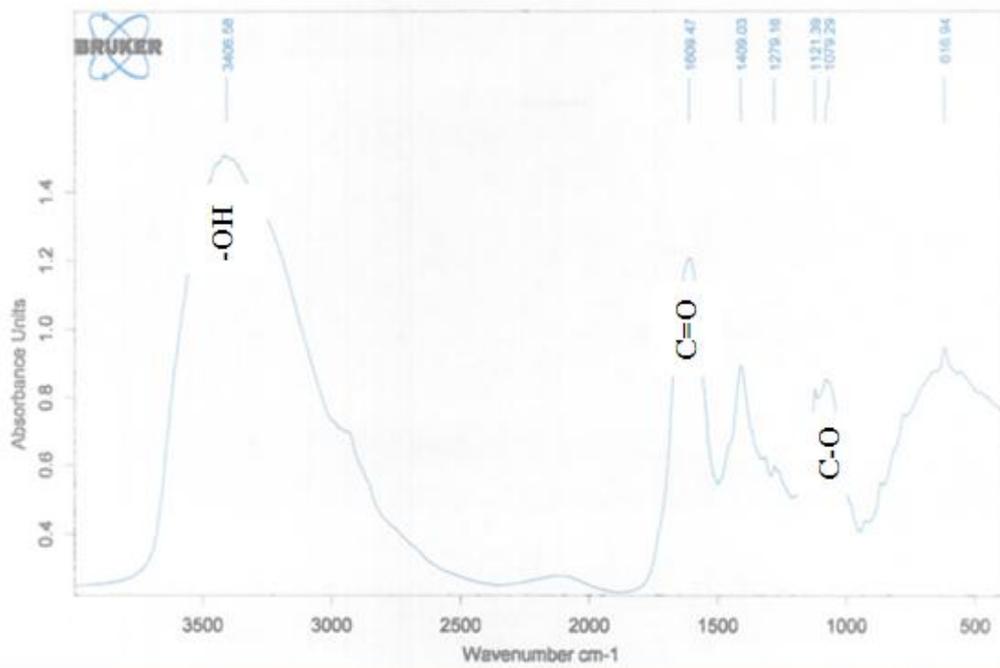
Chromatogramme de l'extrait éther di éthylique d'*Euphorbia* sp.



Chromatogramme de l'extrait acétate d'éthyle d'*Euphorbia* sp.



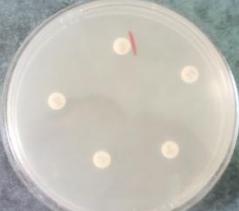
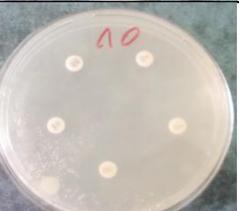
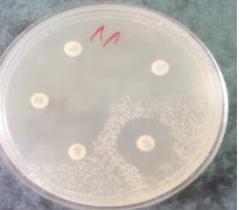
Chromatogramme de l'extrait butanolique d'*Euphorbia sp*



Chromatogramme de l'extrait aqueux d'*Euphorbia sp*.

Annexe V

Les résultats de l'antibiogramme (avec l'extrait et avec les antibiotiques :

	Avec l'extrait	Avec les antibiotiques	Avec l'extrait	Avec les antibiotiques
<i>E coli</i>				
				
<i>S aureus</i>				
				
Streptocoque D				
				

ملخص:

تعتبر النباتات الطبية مصدرا جديدا وطبيعيا مضادا للبكتيريا، عدة عائلات تتطور على نطاق واسع في جنوب الجزائر، مثل *Euphorbia sp*، وتستخدم في الطب التقليدي لعلاج تهيج الجلد. وفي هذا الصدد يستند هذا العمل على دراسة الفلافونويدات الموجودة في النبتة بهدف استخلاص النشاط المضاد للبكتيريا

فلافونويدات النبتة *Euphorbia sp* تم الحصول عليها عن طريق النقع باستخدام 3 مذيبات: الأثير دي الإيثيل، خلات الإيثيل ون بيوتانول. غلثهم على التوالي: 6.6% / 3.9% / 1.96% و 1.7% بالنسبة للمرحلة المائية. تم تقييم محتوى الفلافونويد باستخدام طريقة $AlCl_3$ ومضمونها هو 0.0147 / 0.0125 / 0.247 و 0.31 (mg EQ/g) في الأثير دي الإيثيل، ل خلات الإيثيل، بيوتانول والمرحلة المائية على التوالي. تم تحديد النشاط المضاد للبكتيريا على ثلاث سلالات: *Staphylococcus aureus*, *Streptocoque D* et *Escherichia coli*. وفقا لطريقة نشر القرص ويمثل حساسية هذه البكتيريا في الترتيب التالي *S. aureus* > *Streptocoque D* > *E. coli*.

كلمات البحث: النباتات الطبية، Euphorbiaceae، الفلافونويدات النشاط المضاد للبكتيريا.

Résumé :

Les plantes médicinales offrent une nouvelle et naturelle source antibactérienne, plusieurs famille se développent en Algérie comme *Euphorbia sp* elle est très répandue au sud algérien, utilisée en médecine traditionnelle pour le traitement des irritations de la peau. Dans ce contexte le présent travail repose essentiellement sur l'étude des flavonoïdes contenus dans ces plantes dans le but d'évaluer leurs activités antibactérienne.

Les flavonoïdes d'*Euphorbia sp* sont obtenus par macération en utilisant 3 solvants: éther di éthylique, acétate d'éthyle et n-butanol.

Les rendements respectifs sont : 6,6% / 3,9% / 1,96 % et en fin 1,7% pour la phase aqueuse.

La teneur totale en flavonoïdes pour chaque extrait a été évaluée en utilisant la méthode $AlCl_3$, leur teneur est 0,0147/0,0125/0,247 et 0,31(mg EQ/g) dans les extraits d'éther di éthylique, d'acétate d'éthyle, butanol et la phase aqueuse respectivement.

L'activité antibactérienne a été déterminée sur trois souches : *Staphylococcus aureus*, *Streptocoque D* et *Escherichia coli*. Selon la méthode de diffusion de disque

La sensibilité de ces bactéries est représenté selon l'ordre suivant :

S. aureus > *Streptocoque D* > *E. coli*.

Mots clés : plante médicinal, Euphorbiaceae, Flavonoïdes, activité antibactérienne.

Abstract

Medicinal plants may offer a natural and new source of antibacterial agents. Many families growing in Algeria such as *Euphorbia sp*, this family is very widespread in the south of Algeria. Have been used as medicinal plants in the treatment for skin diseases. In this context the present work focuses essentially on the flavonoids contained in this plant, the objective is evaluation of antibacterial activities. The flavonoids of *Euphorbia sp* were obtained by maceration with three (3) solvents: ether di ethylique, ethyl acetate, n-butanol and phase aqueuse.

The yields were: 6,6%, 3,9%, 1,96%, 1,7%, respectively. The flavonoïd content was determined using a method $AlCl_3$, it was respectively: 0, 0147/ 0,0125/ 0,247/ 0,31(mg EQ/g) in ether di ethylique , ethyl acetate, n-butanol and phase aqueuse. In addition the evaluation of the antibacterial activity of extract of the endemic *Euphorbia sp* by the disc diffusion assay

Was performed against three bacteria , strains *staphylococcus*, *Streptocoque D*, *E-coli*.

The sensitivity order was illustrated by the corresponding inhibition zone diameter to be:

S. aureus > *Streptocoque D* > *E. coli*.

Key words: medicinal plant, Euphorbiacéae, flavonoids, antimicrobial activity.