

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Ecole Nationale Polytechnique



Département de Génie de l'Environnement

Mémoire de Master

Thème :

**Etude de l'effet antibactérien des extraits du
*d'Eriobotrya japonica***

Etudié par :

M^{lle} Asma GREICHI

Soutenu le 17 Juin 2015 devant le jury composé de :

Président :	Mr H. GRIB	Professeur, ENP
Examineur :	Mr R. BOUARAB	Professeur, ENP
Encadrants :	Mr N. MAMERI	Professeur, ENP
	Mr M. KHERAT	Doctorant-Chercheur, ENP

JUIN 2015

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier les honorables membres du jury de ma soutenance, d'avoir accepté de consulter et de juger mon travail : Pr. Grib et Pr. Bouarab, ainsi que mes promoteurs : Pr. Mameri et Mr Kherat pour leur précieux conseils et remarques

Toute ma reconnaissance va également à tout le corps professoral que j'ai connu à l'École nationale Polytechnique, pour la qualité de la formation que j'ai eue, mais je n'oublie d'exprimer ma gratitude au Pr. Hayahem, le directeur de l'École Préparatoire aux Sciences et Techniques de Annaba, ainsi que Messieurs Daradji, Laalem, Tyah et Madame Djeghaba, mes professeurs de la même école pour les deux années de sciences fondamentales qui me resteront gravées à jamais dans l'esprit.

J'adresse aussi mes remerciements à toutes les personnes qui m'ont aidé à réaliser ce modeste travail : Kacuthar, Cherifa, Radia et Nihad, ainsi que tous mes amis et camarades de la promotion 2015 du Génie de l'environnement.

À toute ma famille, sans qui je ne serai celle que je suis aujourd'hui,

MÉRCI

Dédicaces

À mes très chers parents sans qui je ne serais où j'en suis aujourd'hui

À mon oncle préféré Hamid et son épouse Samia

À la mémoire de ma tante Nadia

À mes chers frères Nazim, Rachdi et Walid

À mon unique et adorable sœur Nihad

À mes belles sœurs

Mon neveu Amir Said et ma nièce Chiraz

Les chouchous de la famille Racim, Sarah, Lotfi, Neïla et Doria

Mes amies : Kacouther, Cherifa, Hadjer, Khadidja et Rokia

Asma

Table des matières

Introduction générale.....	Erreur ! Signet non défini.
1 Activité antibactérienne des plantes	Erreur ! Signet non défini.
1.1 Les bactéries :.....	Erreur ! Signet non défini.
1.1.1 Définition :	Erreur ! Signet non défini.
1.1.2 Description des souches utilisées.....	Erreur ! Signet non défini.
1.2 La thérapie de la nature :	Erreur ! Signet non défini.
2 Les Eriobotya japonias	Erreur ! Signet non défini.
2.1 Plantation du Eriobotya japonia :.....	Erreur ! Signet non défini.
2.2 Taille du Eriobotya japonia :	Erreur ! Signet non défini.
2.3 Utilisation thérapeutique :.....	Erreur ! Signet non défini.
3 L'extraction.....	Erreur ! Signet non défini.
3.1 Définition de l'extraction :.....	Erreur ! Signet non défini.
3.2 Les facteurs influençant l'extraction :.....	Erreur ! Signet non défini.
3.2.1 Influence du solvant et pH :.....	Erreur ! Signet non défini.
3.2.2 Température :.....	Erreur ! Signet non défini.
3.2.3 Le temps d'extraction :	Erreur ! Signet non défini.
3.2.4 La taille des particules :	Erreur ! Signet non défini.
3.2.5 L'agitation du fluide :	Erreur ! Signet non défini.
3.2.6 Le taux de l'humidité du solide :	Erreur ! Signet non défini.
4 Matériels et méthodes.....	Erreur ! Signet non défini.
4.1 Matériel végétal :.....	Erreur ! Signet non défini.
4.1.1 Les Eriobotya japonias :	Erreur ! Signet non défini.
4.2 Matériel et solvants utilisés lors de l'extraction :.....	Erreur ! Signet non défini.
4.2.1 Matériel :	Erreur ! Signet non défini.
4.2.2 Verrerie :.....	Erreur ! Signet non défini.
4.2.3 Solvants :	Erreur ! Signet non défini.
4.3 Matériel pour l'analyse antibactérienne :.....	Erreur ! Signet non défini.
4.3.1 Les souches utilisées :.....	Erreur ! Signet non défini.
4.3.2 Matériel utilisé :.....	Erreur ! Signet non défini.
4.4 Préparation des extraits :.....	Erreur ! Signet non défini.
4.4.1 Extraction par Soxhlet :.....	Erreur ! Signet non défini.
4.4.2 Extraction par macération :.....	Erreur ! Signet non défini.

4.4.3	Concentration des extraits :.....	Erreur ! Signet non défini.
4.5	L'étude de l'activité antibactérienne :.....	Erreur ! Signet non défini.
5	Résultats et discussion.....	Erreur ! Signet non défini.
5.1	Résultats	Erreur ! Signet non défini.
5.1.1	Effets des différents extraits :	Erreur ! Signet non défini.
5.2	Résultats de l'activité antimicrobienne des différents extraits : ...	Erreur ! Signet non défini.
5.3	Discussion :	Erreur ! Signet non défini.
5.3.1	Comparaison des effets antibactériens des différents extraits :	Erreur ! Signet non défini.
5.3.2	Comparaison de l'activité sur les différentes espèces bactériennes :	Erreur ! Signet non défini.
	ملخص:	Erreur ! Signet non défini.
	Résumé :.....	Erreur ! Signet non défini.
	Abstract:.....	Erreur ! Signet non défini.
	Bibliographie.....	Erreur ! Signet non défini.

Liste des figures :

- Figure 2-1 : feuilles du Neflier **Erreur ! Signet non défini.**
- Figure 4-1 : les *Eriobotrya japonicas* **Erreur ! Signet non défini.**
- Figure 4-2 : Dispositif d'extraction par soxhlet **Erreur ! Signet non défini.**
- Figure 4-3 : macération des *Maclura Pomiféra* **Erreur ! Signet non défini.**
- Figure 4-4 : Concentration de l'extrait par un rotavapeur..... **Erreur ! Signet non défini.**
- Figure 4-5 : procédé d'extraction des *Eriobotrya japonicas*..... **Erreur ! Signet non défini.**
- Figure 4-6 : Schématisation de la mise en œuvre d'un antibiogramme. **Erreur ! Signet non défini.**
- Figure 5-1 : Effet antibactérien des solvants seuls **Erreur ! Signet non défini.**
- Figure 5-2: la sensibilité des trois souches..... **Erreur ! Signet non défini.**
- Figure 5-3: l'effet des solvants sur la croissance bactérienne..... **Erreur ! Signet non défini.**
- Figure 5-4 : Sensibilité de la *Staphylococcus aureus* **Erreur ! Signet non défini.**
- Figure 5-5 : Sensibilité de la *Pseudomonas aeruginosa* **Erreur ! Signet non défini.**
- Figure 5-6 : Sensibilité de la *Escherichia coli* **Erreur ! Signet non défini.**

Liste des tableaux :

Tableau 4-1 : Caractéristiques des solvants utilisés lors de l'extraction.....**Erreur ! Signet non défini.**

Tableau 4-2 : Tableau récapitulatif des procédés d'extraction des *Eriobotya japonias* **Erreur ! Signet non défini.**

Tableau 4-3 : les conditions opératoires de la concentration**Erreur ! Signet non défini.**

Tableau 5-1 : Effet des solvants sur les souches bactériennes (diamètres donnés en mm)
.....**Erreur ! Signet non défini.**

Tableau 5-2 : Résultats de l'activité antibactérienne d'extraits hexaniques**Erreur ! Signet non défini.**

Tableau 5-3 : Résultats de l'activité antibactérienne d'extraits chloroformiques**Erreur ! Signet non défini.**

Introduction

générale

Introduction générale

Les plantes médicinales sont utilisées depuis l'antiquité, pour soulager et guérir les maladies humaines. En fait, leurs propriétés thérapeutiques sont dues à la présence de centaines, voire des milliers de composés naturels bioactifs appelés: les métabolites secondaires. Ces derniers sont par la suite accumulés dans différents organes et parfois dans des cellules spécialisées de la plante.

Actuellement, le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques a conduit les chercheurs à puiser dans le monde végétal et particulièrement les plantes médicinales et culinaires en quête de molécules naturelles efficaces et dénuées de tout effet adverse.

L'Algérie possède une flore végétale riche et diversifiée. Parmi les plantes médicinales qui constituent le couvert végétal, se trouve le genre *Rosacées*, ce dernier est largement distribué surtout dans les régions semi arides. De nombreuses espèces de ce genre sont utilisées en médecine traditionnelle parce qu'elles renferment plusieurs molécules douées d'activités thérapeutiques, parmi les espèces les plus connues se trouve les *Eriobotya japonias*. Cette plante largement utilisée pour traiter divers maladies bactériennes.

Dans ce contexte s'inscrit le présent travail de recherche dont le but principal est d'étudier les activités antimicrobiennes des différents extraits organiques des *Eriobotya japonias*. La majorité des recherches ont étudié les huiles essentielles, alors que certaines d'entre elles ont étudié les extraits organiques et aqueux.

Le présent travail a pour objectif d'extraire les molécules bioactives, comme il vise à tester les activités biologiques des différents extraits organiques surtout l'activité antimicrobienne.

Chapitre 1 :
Activité
antibactérienne des
plantes

1 Activité antibactérienne des plantes

Introduction

Les plantes sont utilisées depuis l'antiquité par l'homme pour traiter diverses maladies. Ces végétaux ont l'avantage d'être constitués d'un éventail de composés qui possèdent potentiellement de nombreuses activités biologiques. (Badiaâ ER-ROUISSI, 2014). Parmi ces activités, nous allons nous concentrer sur les activités antimicrobiennes, ces dernières présentent un intérêt particulier dans plusieurs domaines tel que le domaine médical, l'industrie pharmaceutique, l'agroalimentaire et le cosmétique. (Maria C. Rota, 2008)

1.1 Les bactéries :

1.1.1 Définition :

Les bactéries sont des organismes composés pour la plupart d'une seule cellule. Une bactérie est en moyenne 10 à 100 fois plus petite qu'une cellule humaine. Sa taille se situe entre 0.5 et 5µm (Linder, 2010).

Quand on parle de bactéries, on pense immédiatement aux maladies, aux infections et à une multitude d'événements négatifs liés à ces microbes. Les épidémies de peste ou de choléra ont marqué et marquent encore notre histoire. Le retour de la tuberculose sur le devant de la scène, les difficultés de traitement suite aux résistances multiples aux antibiotiques font bien souvent la une des journaux. Pourtant seule une infime minorité des bactéries est pathogène. L'immense majorité des bactéries est bénéfique et indispensable aux processus biologiques. (Linder, 2010) En effet, les trois espèces qui ont été utilisées sont responsables de nombreuses infections nosocomiales.

1.1.2 Description des souches utilisées

1.1.2.1 *Staphylococcus aureus* :

Staphylococcus aureus est une coccobactérie Gram positif, catalase positive appartenant à la famille des *Staphylococcaceae*. Elle a un diamètre d'environ 0,5 à 1,5 µm, immobile, asporulé et anaérobique, ils se divisent sur plusieurs plans pour former des amas habituellement disposé en grappes.(C. Bouchiat, 2015)

S. aureus réside souvent sur les surfaces de la peau et des muqueuses, les aisselles et le périnée.(Timothy J. Foster, 2015)

Les staphylocoques ont un pouvoir pathogène opportuniste extrêmement large qui s'exerce avec une grande fréquence en milieu hospitalier.(Leclerc, 1995)

1.1.2.2 *Pseudomonas aeruginosa* :

Il s'agit d'un petit bacille, mobile grâce à son flagelle simple qui appartient à la famille des Pseudomonadaceae. C'est une bactérie à Gram négatif de 1,5 µm sur 0,5 et aérobie strict.(Leclerc, 1995)

On les retrouve partout dans la nature, dans l'eau, le sol, les plantes, les animaux et l'homme(Stephanie Rolsma, 2015)

Les infections à *Pseudomonas aeruginosa* sont le plus souvent des infections d'origine nosocomiale. En milieu hospitalier il est à l'origine de surinfections et de suppurations locales ou profondes. (Xavier Bertrand, 2011)

1.1.2.3 *Escherichia coli* :

Escherichia coli est un bacille à gram négatif, de forme non sporulée, de type anaérobie facultative. Elle est généralement mobile grâce à ses flagelles, sa longueur varie de 2 à 6 µm, alors que sa largeur est de 1,1 à 1,5 µm. (Leclerc, 1995)

Elle constitue la majeure partie de la flore microbienne aérobie du tube digestif de l'homme (10 / g de selles), et de nombreux animaux;elle est un indicateur de contamination fécale dans les milieux naturels, dans l'eau et les aliments.(Leclerc, 1995)

Certaines souches sont virulentes, capables de déclencher spécifiquement chez l'homme ou chez certaines espèces animales des infections spontanées des voies digestives ou urinaires ou bien encore des méningites néo-natales.(Szapiro-Manoukian, 2011)

1.2 **La thérapie de la nature** :

Les plantes sont une excellente source de molécules bioactives et potentiellement antibactériennes.Dans la plante (prenons le cas de l'écorce de saule qui contient justement l'aspirine), il y a un grand nombre de molécules différentes qui agissent en harmonie. Cela repose sur le choix des plantes qui entrent dans leur composition. Il faut sélectionner de manière très rigoureuse l'espèce, la partie active de la plante (racine, sommité fleurie, tige, feuille, fruit), les conditions de culture (exposition au soleil, sol, climat) et la période adéquate pour la cueillette. Ensuite les plantes sont contrôlées en subissant de nombreuses analyses (bactéricides et pesticides), mais aussi la teneur en principes actifs qui doit être reproductible quel que soit l'arrivage.(PHARMACEUTIQUES, 2007)

Pour ce projet de master on a préféré l'étude sur les extraits de *Eriobotya japonias*, comme une bonne source d'antibiotique, donc le prochain chapitre détaillera la plante et montrera son importance thérapeutique contre les différentes maladies bactériennes.

Chapitre 2 :
Les Eriobotya
japonias

2 Les Eriobotya japonias

2.1 Plantation du Eriobotya japonia :

Comme la plupart des arbres fruitiers, la plantation du Eriobotya japonia s'effectue à l'automne. Cela afin de favoriser l'enracinement avant l'hiver et obtenir une meilleure reprise au printemps. Mais pour les sujets achetés en conteneur, il est aussi possible de planter au printemps à condition d'accentuer l'arrosage au début.

- Le Eriobotya japonia aime les situations plutôt ensoleillées, au risque de ne pas produire de nèfle.
- C'est un arbre qui s'adapte à la plupart des sols, à condition qu'il soit bien drainé et pas trop lourd.
- Un mélange de terreau plantation et terre de jardin convient parfaitement pour planter un Eriobotya japonia.
- Un arrosage régulier durant la 1ère année suivant la plantation est recommandée.

(Pollmann, 2012)

2.2 Taille du Eriobotya japonia :

Il est tout à fait possible de tailler le Eriobotya japonia tout au long de sa vie, pour le garder à la taille et pourra donc s'intégrer de façon très homogène dans l'ensemble des jardins. Ces quelques gestes amélioreront également la croissance du Eriobotya japonia :

- Supprimez les branches mortes ou malades au fur et à mesure.
- A l'automne, taillez les branches fragiles
- A la fin de l'hiver, supprimez les branches qui poussent vers l'intérieur et équilibrez la ramure. (GUINGOI, les arbres fruitiers formes et tailles, 1982)

2.3 Utilisation thérapeutique :

Le Eriobotya japonia est connu comme plante médicinale, en particulier pour ses propriétés toniques (juguler des dérangements divers), astringents (lavage des blessures), béchiques (calmer la toux), stomatiques et anti diarrhéique. Toutes les parties de la plante ne sont pas utilisées à des bienfaits thérapeutiques. Seul le feuillage, les graines et le fruit sont

utilisés. OÙ son feuillage s'utilise en décoction, qui permet d'extraire dans de l'eau bouillante des tannins. Ils sont employés le plus souvent extérieurement contre les inflammations de la cavité buccale, les catarrhes, la bronchite, les hémorragies locales, sur les brûlures et les engelures, les plaies, les inflammations dermiques, les hémorroïdes et la transpiration excessive. Le feuillage est donc utilisé pour ces propriétés béchiques et astringentes. (technologies, 2015)



Figure 2-1 : feuilles du Neflier

3 L'extraction

3.1 Définition de l'extraction :

L'extraction, est la séparation de la portion active des plantes de sa portion inerte par des techniques utilisant des solvants sélectifs. De nombreuses techniques d'extractions existent tel que l'infusion, la décoction, la macération, l'hydrodistillation, l'extraction par solvant (soxhlet) et par fluide supercritique. Après extraction on obtient un produit liquide impure, semi-solide et ou poudre.(Jean LEYBROS, 1990)

Le but de ces techniques est d'extraire les portions actives des plantes qui se constituent des biomolécules possédant une activité biologique pour servir à différents remèdes thérapeutique, qui seront utilisés sous forme de médicaments traditionnels (à base de plantes médicinales). (Sukhdev Swami Handa, 2008)

3.2 Les facteurs influençant l'extraction :

Les phénomènes de transfert de soluté dans le solide, en l'occurrence la matière végétale, sont influencés par plusieurs facteurs qui interviennent de manière plus ou moins significative sur les performances de l'extraction, à savoir la vitesse d'extraction, la concentration de l'extrait et le rendement d'extraction. Nous pouvons citer : le type de solvant, le rapport des solvants à la matière végétale, la température, le temps et la structure de la matière (par exemple, taille des particules, organe végétal).(A. B. Golovanchikov t, 1998)

3.2.1 Influence du solvant et pH :

L'extraction par solvant des composés phytochimiques dépend de la dissolution de chaque composé de la matière végétale et de leurs diffusions dans le solvant externe, ce qui nécessite un bon choix de solvant (Elias Kiassos, 2009). Le choix du solvant se fait selon :(CISSE, 2010) (Rachel, 2007)

- Sélectivité
- Température d'ébullition peu élevée
- Grande capacité de dissolution
- Faible viscosité.
- Sécurité de manipulation (point d'éclair, inflammabilité, toxicité).
- Bas prix et possibilité de recyclage.

Les solvants les plus utilisés sont l'eau, les alcools (méthanol, éthanol), les hydrocarbures (hexane), le CO₂ supercritique. (S Sasidharan, 2011). Certains solvants organiques tel que le méthanol sont efficaces pour l'extraction des composés phytochimiques à partir d'une matière végétale, et offrent des rendements élevés mais vu leur toxicité il est préférable de les remplacer par l'eau, l'éthanol, ou un mélange des deux.(Chew, 2011).

Le pH du solvant d'extraction peut être modifié pour améliorer l'extraction de certains composés bioactifs végétaux de manière sélective. En effet, la solubilité de certains composés dépend du pH. Pour l'eau, il peut jouer un rôle dans la solubilisation de la fraction hydrolysable. Il agit également sur les hydrolyses chimiques et enzymatiques (B.K. Tiwari, 2013).

3.2.2 Température :

La température d'extraction influe sur la diffusion des composés phytochimiques de la matière végétale, une température plus élevée augmente la vitesse de diffusion et réduit le temps d'extraction, mais cela peut provoquer une augmentation de la concentration de certaines molécules indésirables dans l'extrait. Une température trop élevée peut entraîner la décomposition des constituants cellulaires et ainsi libération des produits phytochimiques, comme elle peut inhiber l'activité enzymatique. En pratique la température généralement utilisée pour l'extraction dépend de la température d'ébullition du solvant choisi. (Philippe Evon, 2012)

3.2.3 Le temps d'extraction :

Le temps d'extraction des composés phytochimiques à partir des plantes médicinales nécessaire pour effectuer une extraction complète varie en fonction de l'espèce végétale, la taille des particules de la matière et l'organe de la plante (R. Wongkittipong, 2004).

3.2.4 La taille des particules :

Le matériel végétal peut subir un broyage ou concassage avant l'extraction pour réduire la taille des particules car plus la taille des particules est petite, plus le solvant extrait rapidement et le temps de la teneur est maximal. Mais ceci n'aura pas une grande influence sur l'extraction Soxhlet. Ceci a été confirmé en comparant plusieurs concentrations finales après extraction à partir de particules de différents diamètres. Pour les autres techniques, l'inconvénient du broyage ou concassage des plantes avant l'extraction est que les fines particules peuvent bloquer les filtres plus rapidement que les particules plus grosses, ce qui

pourrait éventuellement entraîner le gaspillage de l'extrait et augmentation du temps d'extraction (B.K. Tiwari, 2013).

3.2.5 L'agitation du fluide :

L'agitation du solvant en contact avec le solide influe sur la performance de l'extraction solide-liquide. Une agitation continue favorise les chocs entre les différentes particules. Ceci va provoquer l'éclatement de certaines cellules qui vont libérer alors leur contenu cellulaire dans le solvant. (CISSE, 2010).

L'agitation mécanique des particules dans le solvant permet le maintien des particules en suspension et permet d'assurer l'homogénéité du milieu, ce qui a un effet toujours favorable sur l'opération (CISSE, 2010).

3.2.6 Le taux de l'humidité du solide :

Lors de l'utilisation des solvants hydrophobes, la présence d'eau dans la matière végétale peut freiner la pénétration du solvant dans la cellule ce qui aura pour conséquence le ralentissement du processus d'extraction (Rachel, 2007).

Chapitre 3 :
Matériels
et Méthodes

4 Matériels et méthodes

Introduction :

Afin d'étudier l'effet des différents extraits sur la croissance de trois espèces bactériennes différentes, nous avons suivi la méthodologie suivante :

- Extraction
- Concentration de l'extrait
- Évaluation de l'effet antimicrobien

Dans ce chapitre nous allons détailler le protocole expérimental suivi et décrire le matériel qui a été utilisé lors des expérimentations (équipement de laboratoire et matériel biologique).

4.1 Matériel végétal :

4.1.1 Les *Eriobotya japonias* :

Les feuilles du *Eriobotya japonias* ont été cueillies dans la région de Ain Taya, elles ont été rincées à l'eau distillée avant d'être séchées à l'étuve à 50°C pendant 24h. Elles ont ensuite été broyées en particules très fines pour faciliter l'extraction.



Figure 4-1 : les *Eriobotya japonias*

4.2 Matériel solvants utilisés lors de l'extraction :

4.2.1 Matériel :

- Chauffe ballon (Wisd) a été utilisé pour chauffer et réguler la température pendant l'extraction.
- Une étuve (memmert) réglée à 50°C pour le séchage des plantes
- Une étuve (nüve) équipée d'un agitateur réglé à 30°C pour la macération des plantes
- Une balance de précision (OHAUS) pour les différentes pesées.
- Un rotavapeur (Heidolph) pour la concentration des extraits à une pression réduite.

4.2.2 Verrerie :

La verrerie qu'on a utilisée pour l'extraction est :

- Soxhletde 150 mL (SHUNIU GG-17).
- Réfrigérant pour condenser le solvant (SHUNIU GG-17)
- un ballon de 250 mL (SHUNIU GG-17)

4.2.3 Solvants :

Les solvants utilisés pour réaliser nos extractions sont cités dans le tableau suivant :

Tableau 4-1 : Caractéristiques des solvants utilisés lors de l'extraction

Caractéristiques	Hexane	Chloroforme	Éthanol	Eau
Formule brute	C ₆ H ₁₄	CHCl ₃	C ₂ H ₆ O	H ₂ O
Masse moléculaire (g/mol)	86,2	119,38	46,07	18,0153
d ²⁰	0,66	1,479	0,789	0,997 05
Température de fusion (°C)	-95,3	-63,5	-114	0
Température d'ébullition (°C)	68,7	61,2	78.37	100
Température d'auto inflammation	-26	/	363	/
Indice de réfraction à 20 (°C)	1,37	1,45	1,3594	1,3325
Pureté (%)	99,9	99,9	99,8	

Tous les solvants ont été prélevés sous une hotte pour des raisons de sécurité.

4.3 Matériel pour l'analyse antibactérienne :

4.3.1 Les souches utilisées :

Les souches bactériennes utilisées sont des souches de référence obtenues auprès de l'American Type Culture Collection (ATCC). Pour notre étude, les souches utilisées sont : *Escherichia coli* (ATCC25922) : *Staphylococcus aureus* (ATCC25923) et *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853). Toutes ces souches ainsi que la gélose nutritive ont été aimablement fournies par le Laboratoire des milieux des cultures de l'Institut Pasteur Mohamed, Belouizdad, Daïra Hussein Dey, Alger.

4.3.2 Matériel utilisé :

Pour effectuer les analyses antimicrobiennes nous avons utilisé :

- Bain marie (memmert) pour faire fondre les milieux de culture.
- Autoclave (nüve) pour la stérilisation du matériel.
- Étuve (SELECTA) réglée à 37°C pour l'incubation des boîtes de pétri
- Bec Bunsen pour assurer la stérilité de la zone de travail.
- Des boîtes de pétries.
- Pipettes pasteurs.
- Pince en inox
- papiers Whatman pour les disques de l'antibiogramme.
- Toutes les manipulations ont été réalisées sous une hotte microbiologique (telSTAR mini-V/PCR) préalablement stérilisée par UV.

4.4 Préparation des extraits :

4.4.1 Extraction par soxhlet :

La matière végétale pesée a été placée dans une cartouche en cellulose. Cette dernière a ensuite été déposée dans un extracteur de type soxhlet, équipé à sa base d'un ballon de 250 ml dans lequel se trouve le solvant.

Le ballon a été chauffé avec un chauffe-ballon, et un réfrigèrent permettait de condenser les vapeurs de solvant.



Figure 4-2 : Dispositif d'extraction par soxhlet

4.4.2 Extraction par macération :

La macération de laplantes est réalisée à 45°C dans une étuve équipée d'un agitateur orbital qui tournait à une vitesse de 114 tours par minute, et ce, pour assurer l'homogénéité de la solution qui contient la matière végétale

La matière végétale est placée dans un Erlen-Meyer de 500 mL contenant 400 ml d'eau distillée stérile.

A la fin de la macération, l'extraits était filtrés et mis ensuite dans un tube à essais stérile puis conservé à 4°C.



Figure 4-3 : macération des *Maclura Pomifera*

Le tableau ci-dessous résume les quantités de matière végétale et de solvant utilisées, ainsi que les conditions opératoires pour chaque plante.

Tableau 4-2 : Tableau récapitulatif des procédés d'extraction des *Eriobotya japonias*

Technique utilisée	Solvant	V_{solvant} (mL)	t_{extraction} (h)	m_{plante} (g)	T (°C)
Soxhlet	Hexane	175	4	10	80
	Éthanol	175	4	10	80
	Chloroforme	175	4	10	65
Macération	Eau	400	7	10	45

4.4.3 Concentration des extraits :

Les extraits obtenus ont été concentrés à l'aide d'un rotavapeur. Ce dernier, possède une pompe d'aspiration qui permet de réduire la pression, ce qui provoque une réduction de la température d'ébullition des solvants.

L'extrait concentré est obtenu par sa séparation du solvant.
Les extraits concentrés ont ensuite été conservés à l'obscurité à 4°C.



Figure 4-4 : Concentration de l'extrait par un rotavapeur

Le tableau ci-dessous résume les conditions opératoires qu'on a utilisées pour la concentration à pression réduite.

Tableau 4-3 : les conditions opératoires de la concentration

E_{solvant}	t_{concentration} (min)	P_{sous-vide} (mbar)	Nbr de rot/min	T (°C)
E _{Hexane}	15	500	55	55
E _{Ethanol}	45	500	40	70
E _{Chloroforme}	45	500	50	45

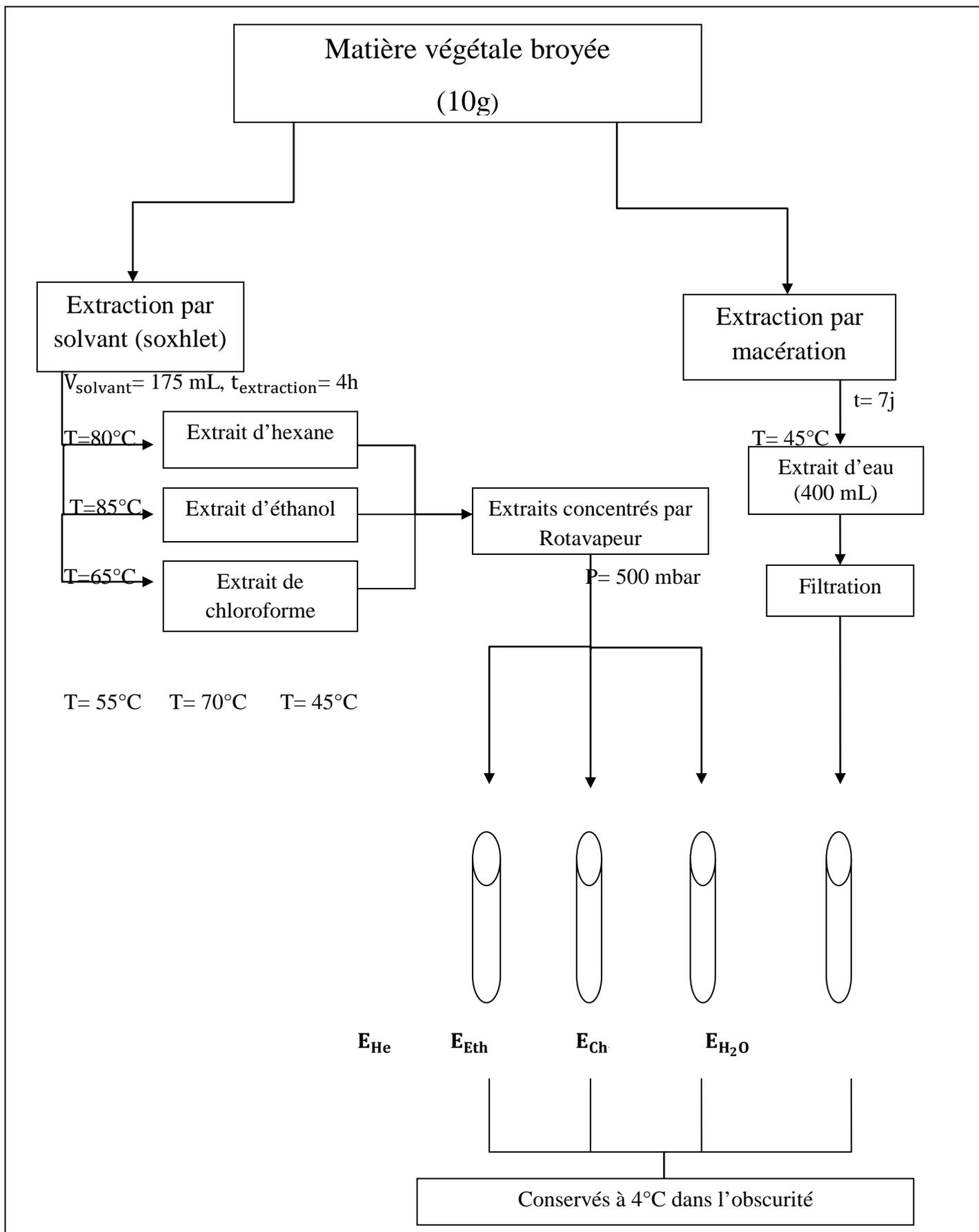


Figure 4-5 : procédé d'extraction des *Eriobotrya japonias*

4.5 L'étude de l'activité antibactérienne :

Afin d'évaluer l'activité antimicrobienne des extraits de plantes, nous avons utilisé la méthode de diffusion en milieu gélosé (méthode de Kirby-Bauer), qui est une méthode semi-quantitative qui permet de déterminer la sensibilité des espèces bactériennes, et ce à partir d'une plage d'inhibition qui apparaît autour d'un disque de papier Whatmann imbibé de l'extrait.

- **Principe de la méthode :**

La réalisation d'un antibiogramme consiste en la recherche de la sensibilité d'une bactérie à un certain nombre d'antibiotiques.

Parmi les différentes méthodes d'évaluation de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques, celle dite de diffusion en milieu gélosé s'avère la plus utilisée pour la réalisation d'un antibiogramme. Cela consiste à placer un disque de papier imprégné d'antibiotique sur la gélose inoculée au préalable. L'antibiotique s'humidifie puis diffuse dans le milieu en provoquant un gradient de concentration décroissant autour du disque. Nous pouvons schématiser tout ce processus comme suit :

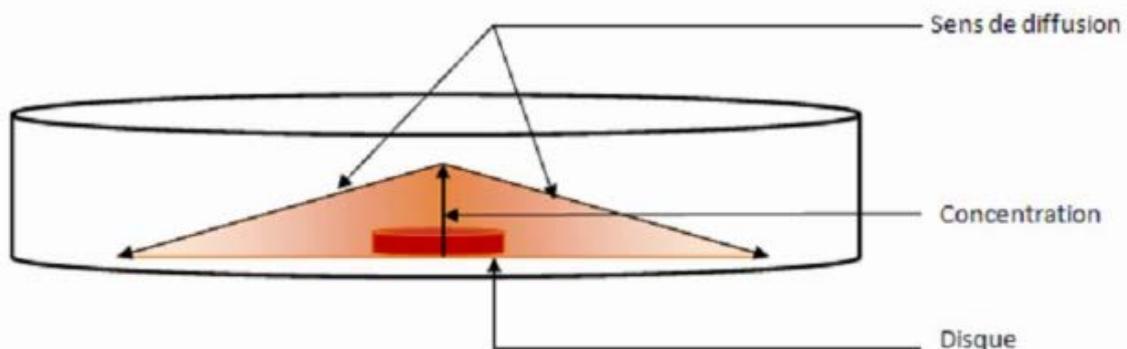


Figure 4-6 : Schématisation de la mise en œuvre d'un antibiogramme.

Le protocole que nous avons adopté pour l'évaluation antibactérienne est le même que celui suivi dans le projet de fin d'étude (GREICHI, 2015).

Chapitre 4 :
Résultats et
discussion

5 Résultats et discussion

5.1 Résultats

Notre étude a porté sur l'évaluation de l'effet antibactérien de différents extraits des *Eriobotya japonias*. Le test de sensibilité a été effectué par la méthode de diffusion des disques et les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés.

Au terme de ce test nous évaluons la richesse de la plante en biomolécules possédant des agents antibactériens et selon la sensibilité des différentes souches bactériennes.

5.1.1 Effets des différents extraits :

L'antibiogramme consiste à chercher la sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques, les figures ainsi que les tableaux ci-dessous rapportent les valeurs en mm des zones d'inhibition observées après mise en contact des extraits avec les différentes souches étudiées.

5.2 Résultats de l'activité antimicrobienne des différents extraits :

5.2.1.1 Les témoins :

Afin de savoir si l'inhibition de la croissance bactérienne n'est pas due au solvant, nous avons étudié séparément l'effet des différents solvants utilisés sur les souches bactériennes.

Les résultats relatifs aux diamètres des zones d'inhibition révélés par les différents extraits sont regroupés ci-dessous

Tableau 5-1 : Effet des solvants sur les souches bactériennes (diamètres donnés en mm)

Bactérie	Solvant			
	Chloroforme	éthanol	Hexane	H ₂ O
<i>Staphylococcus aureus</i>	8	11	/	/
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9	15	/	/
<i>Escherichia coli</i>	12	9	/	/

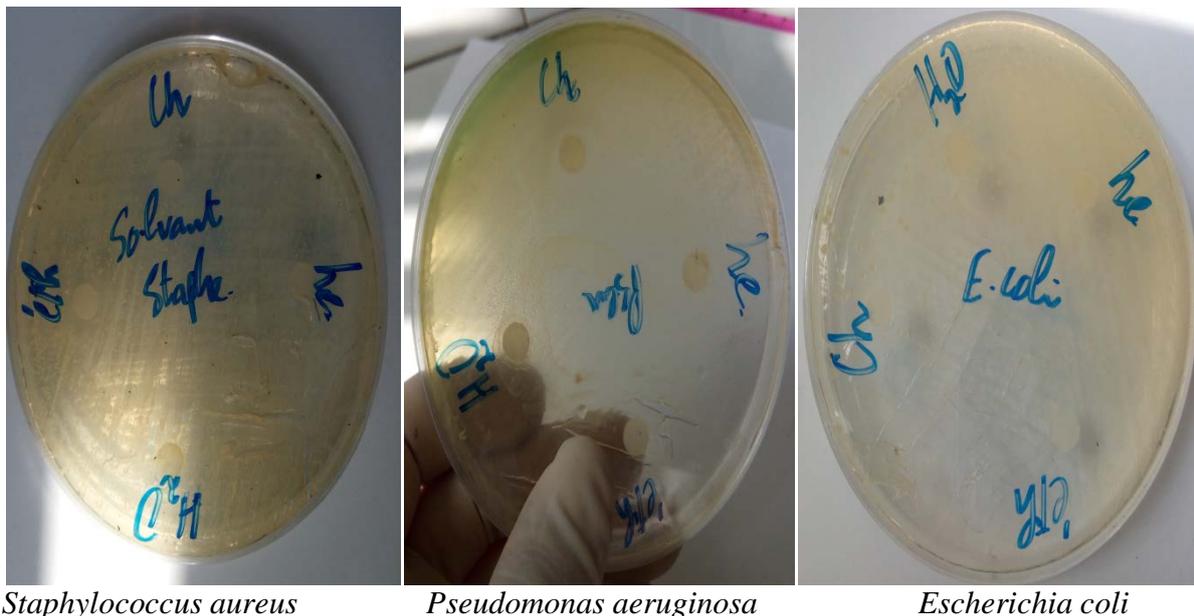
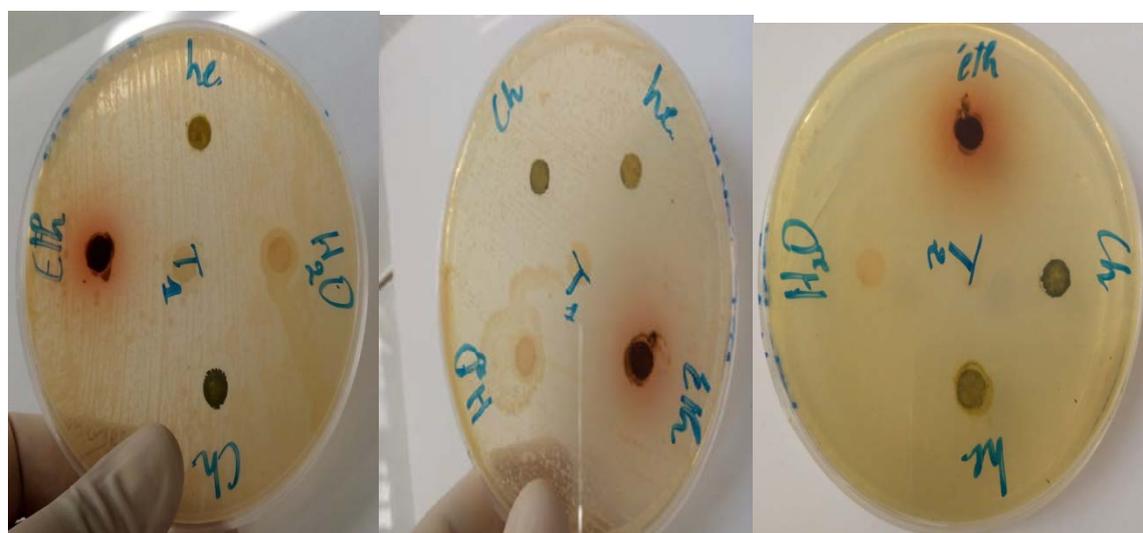


Figure 5-1 : Effet antibactérien des solvants seuls



E. coli S. aureus P. aeruginosa

Figure 5-2: la sensibilité des trois souches

Les tableaux ci-dessous regroupent les diamètres des zones d'inhibition des différents extraits obtenus en utilisant les solvants sur les 3 souches de références.

Tableau 5-2 : Résultats de l'activité antibactérienne d'extraits hexaniques

La plante	Les souches	Diamètre d'inhibition (mm)
<i>Eriobotya japonias</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	13
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14
	<i>Escherichia coli</i>	10

Tableau 5-3 : Résultats de l'activité antibactérienne d'extraits chloroformiques

La plante	Les souches	Diamètre d'inhibition (mm)
<i>Eriobotya japonias</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	12
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14
	<i>Escherichia coli</i>	13

Tableau V.2 : Résultats de l'activité antibactérienne d'extraits éthanoïques

La plante	Les souches	Diamètre d'inhibition (mm)
<i>Eriobotya japonias</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	30
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20
	<i>Escherichia coli</i>	19

- **Extraits d'eau :**

La macération de la plantes dans l'eau n'a donné aucun résultat d'inhibition sur toutes les souches. (Voir figures : V.1, V.2 et V.3)

5.3 Discussion :

5.3.1 Comparaison des effets antibactériens des différents extraits :

Au regard de ces résultats, ainsi que la figure ci dessous nous observons que l'extraits éthanoïque est fortement inhibé la croissance des trois souches.

En comparant ces résultats avec les résultats obtenus avec l'éthanol seul, nous constatons qu'il n'y a pas une différence significative, on peut donc en déduire que cette inhibition peut être attribuée en grande partie au solvant utilisé. Ainsi que notre PFE (GREICHI, 2015) prouve les mêmes résultats on les comparant par ceux qu'on a obtenu.

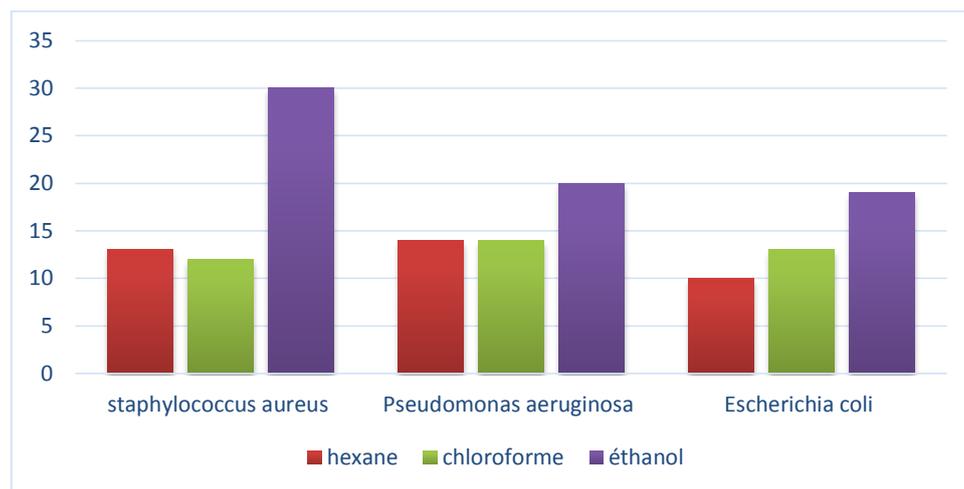


Figure 5-3: l'effet des solvants sur la croissance bactérienne

5.3.2 Comparaison de l'activité sur les différentes espèces bactériennes :

À partir de ces résultats nous allons fixer les seuils d'inhibition pour chaque souche ce qui nous aidera par la suite à comparer les sensibilités bactériennes.

- *Staphylococcus aureus* :

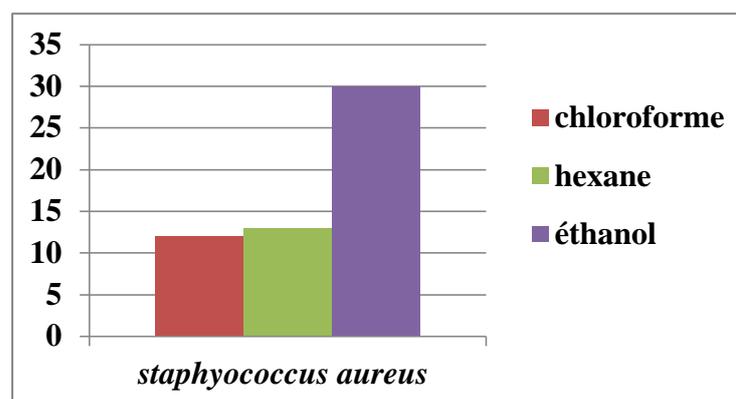


Figure 5-4 : Sensibilité de la *Staphylococcus aureus*

Cette bactérie est très sensible devant les extraits de cette plante tel qu'on remarque sa réponse avec l'éthanol qui est plus élevée ce qui était confirmé par Boudjouref dans son rapport où il expliqua son mécanisme vis-à-vis les antibiotiques (Mourad, 2011)

- *Pseudomonas aeruginosa* :

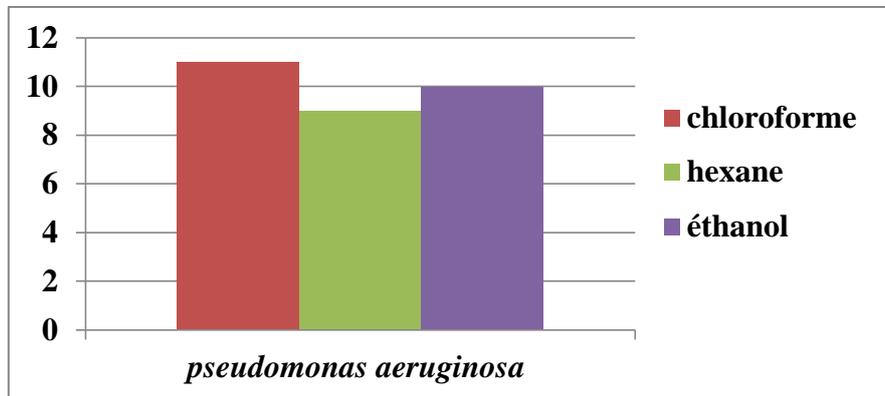


Figure 5-5 : Sensibilité de la *Pseudomonas aeruginosa*

La *Pseudomonas aeruginosa* se révèle comme la souche la plus résistante à tous les extraits. Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par notre PFE (GREICHI, 2015) ainsi qu'avec (Mourad, 2011) qui a démontré la sensibilité des souches que nous avons utilisées aux différents extraits par les solvants choisis.

- *Escherichia coli* :

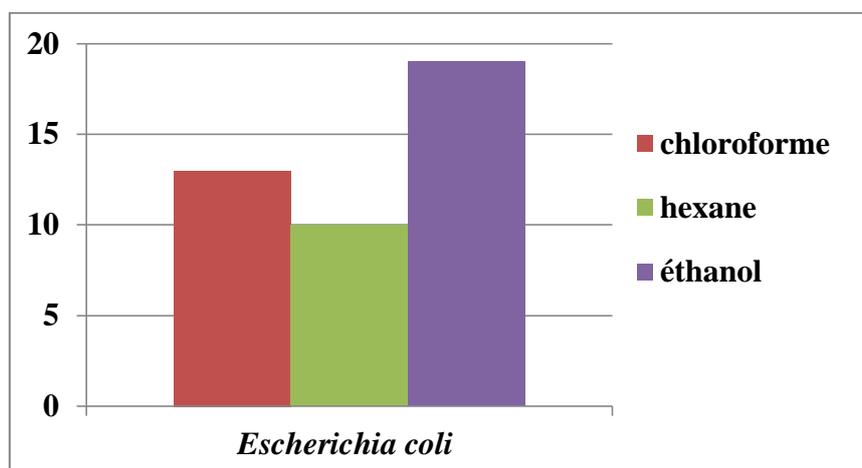


Figure 5-6 : Sensibilité de la *Escherichia coli*

L'inhibition était importante pour les *Eriobotya japonias* mais elle était plus notable pour les extraits d'éthanol et hexane que le chloroforme. Ce qui a été déjà prouvé pendant notre étude de projet de fin d'étude (GREICHI, 2015).

Conclusion

Générale

Conclusion générale

De nos jours, un grand nombre de plantes aromatiques et médicinales possède des propriétés biologiques très importantes qui trouvent de nombreuses applications dans divers domaines à savoir en médecine, pharmacie, cosmétologie et l'agriculture. Ce regain d'intérêt 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.

Dans le présent travail, différents aspects *Eriobotrya japonica* ont été étudiés: quelques propriétés phytochimique et antimicrobiennes des extraits bruts. L'extraction de la plante a permis d'obtenir des rendements qui diffèrent en fonction des solvants utilisés.

L'ensemble de ces résultats obtenus in vitro ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substances d'origine naturelle biologiquement active, une étude in vivo est souhaitable, pour obtenir une vue plus approfondie sur les antimicrobienne des extraits de cette plante.

"دراسة التأثير المضاد للبكتيريا من مستخلصات *Eriobotrya japonica*"

ملخص :

يتناول هذا العمل تقييم النشاط المضاد للبكتيريا لمستخلصات تم الحصول عليها باستخدام مذيبات مختلفة من نبات *Eriobotrya japonica* الطبية جزائرية من أجل إقامة دراسة مقارنة للنشاط الحيوي بها. تم اختبار مستخلصات الهكسان، الكلوروفورم، الايثانول والماء على ثلاثة أنواع من البكتيريا المسببة للأمراض. سمح لنا تقييم النشاط المضاد للبكتيريا بتحديد السلالات الأكثر حساسية والأكثر مقاومة لتقييم تأثير النباتات في علاج الأمراض البكتيرية وكذلك التمييز بين مذيب جيد يستخدم لاستخراج الجزيئات الحيوية التي تتميز بهذا التأثير.

Eriobotrya

تبين من خلال هذا الدراسة أن

japonica هي النبتة ذات التأثير المضاد الأكبر، بينما إتضح أن الايثانول هو المذيب الأفضل لاستخراج المكونات التي تمتلك هذا التأثير

الكلمات المفتاحية: الجزيئات الحيوية، *Eriobotrya japonica*، النباتات الطبية، النشاط المضاد للبكتيريا.

L'effet antibactérien d'extrait d'*Eriobotrya japonica*

Résumé :

Ce travail porte sur l'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits par différents solvants d'*Eriobotrya japonica* comme plante médicinale Algérienne, dans le but d'établir une étude comparative de leur bioactivité.

Les extraits d'hexane, chloroforme, d'éthanol et d'eau on été testés sur trois souches bactériennes pathogènes. L'évaluation de l'activité antibactérienne a permis la sélection des souches les plus sensibles des plus résistantes en vue d'apprécier l'effet de la plante dans le traitement des maladies bactériennes, ainsi que de distinguer le bon solvant qui sert à extraire les biomolécules possédants cet effet.

L'*Eriobotrya japonica* s'est révélé être la plante possédant l'effet antibactérien le plus important, tandis que l'éthanol s'est avéré être le meilleur solvant d'extraction de constituants possédant cet effet à partir des plantes étudiées.

Mots clés : biomolécules, plantes médicinales, activité antibactérienne, d'*Eriobotrya japonica*,

“Study of antibacterial effect of Eriobotrya japonica extracts”

Abstract:

This work deals with the evaluation of the antibacterial activity of extracts obtained using different solvents from *Eriobotrya japonica* as Algerian medicinal plants in order to establish a comparative study of their bioactivity.

The hexane, chloroform, ethanol and water extracts were tested on three pathogenic bacterial strains. The evaluation of antibacterial activity allowed us to select of the most sensitive and the most resistant strains in order to assess the effect of the plant in the treatment of bacterial diseases as well as to distinguish the good solvent used to extract the biomolecules owning this effect.

Thymus vulgaris was found to be the plant with the greatest antibacterial effect, while hexane proved to be the best solvent to extract components having this effect from the tested plants.

Keywords: biomolecules, medicinal plants, antibacterial effect, *Eriobotrya japonica*

Bibliographie

- A. B. Golovanchikov t, M. V. (1998). MEDICINAL PLANTS, EXTRACTION OF ACTIVE COMPONENTS FROM MEDICINAL PLANTS IN ELECTRIC FIELD . *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 429-432.
- B.K. Tiwari, N. P. (2013). *Handbook of Plant Food Phytochemicals, Sources, Stability and Extraction* .USA: Wiley BLACKWELL.
- Badiaâ ER-ROUISSI, A. K. (2014). ETUDES DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE ET ANTIBACTERIENNE DES EXTRAITS DU GERANIUM ROSAT DU GHARB . *Innovation Thérapeutique : du Fondamental à l'Appliqué* , 40.
- C. Bouchiat, N. E.-Z. (2015). Epidemiology of Staphylococcus aureus in Bangalore, India: emergence of the ST217 clone and high rate of resistance to erythromycin and ciprofloxacin in the community. *New Microbes and New Infections*, Pages 15–20.
- Chew, K. K. (2011). Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of Centella asiatica. *International Food Research Journal* , 571- 578 .
- CISSE, M. (2010). COUPLAGE DE PROCÉDÉS MEMBRANAIRES POUR LA PRODUCTION D'EXTRAITS ANTHOCYANIQUES : APPLICATION À L'HIBISCUS SABDARIFFA .
- GREICHI, A. (2015). *Etude de l'effet antibactérien des extraits végétaux*. Alger: ENP.
- GUINGOI, G. (1982). *les arbres fruitiers formes et tailles*. Paris: rustica.
- GUINGOI, G. (1985). *greffer tout les arbres*. Paris: DARGAUD.
- Jean LEYBROS, P. F. (1990). Extraction solide-liquide, Aspects théoriques. *TECHNIQUES DE L'INGÉNIEUR*, J 2780.
- L. Hambaba, K. B. (2012). Étude in vitro des activités antimicrobienne et antioxydante des extraits du fruit d'Elaeagnus angustifolia L. *Phytothérapie*, 6. 350-356.
- Leclerc, H. G.-L. (1995). *Microbiologie générale : la bactérie et le monde bactérien* . Paris : Doin .
- Linder, D. K. (2010). *DES BACTERIES ET DES HOMMES, de la santé au développement durable*. GENEVE: BiOutils, HUG , Université de GENEVE.
- M. Oba Samoussa, A. K. (2011). Étude de la sensibilité aux antibiotiques et aux extraits de quelques plantes médicinales de certains germes issus de la restauration collective . *Nutrition clinique et métabolisme* , 28. S67–S240.
- Maria C. Rota, A. H. (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of Thymus vulgaris, Thymus zygis and Thymus hyemalis essential oils. *Food Control* 19 (2008) 681–687, 19. 681–687.
- Mourad, B. (2011). *Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'Artemisia campestris L.* . Algérie : Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie .

- PHARMACEUTIQUES, L. (2007). *PRECIS de Phytothérapie, la santé par les plantes*. Monaco: Alpen .
- Philippe Evon, V. V. (2012). Manufacturing of renewable and biodegradable fiberboards from cake generated during biorefinery of sunflower whole plant in twin-screw extruder: Influence of thermo-pressing conditions. *3rd International Conference on Biodegradable and Biobased Polymers*, 1940–1947.
- Pollmann, B. (2012). First evidence of *Mespilus germanica* L. (medlar) in Roman Switzerland. *Vegetation History and Archaeobotany*, 21:61-68.
- R. Wongkittipong, L. P. (2004). Solid–liquid extraction of andrographolide from plants—experimental study, kinetic reaction and model. *Separation and Purification Technology*, 147–154.
- Rachel, P. (2007). *METHODOLOGIE POUR LE PASSAGE EN CONTINU D'EXTRACTION DE SOLUTE A PARTIR DE MATIERE VEGETALE*.
- S Sasidharan, Y. C. (2011). Extraction, Isolation and Characterization of Bioactive Compounds from Plants' Extracts. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medecines (AJTCAM)*, 1-10.
- SCHMID, R. D. (2005). *ATLAS DE POCHE DE BIOTECHNOLOGIE ET DE GENIE GENITIQUE*. Paris: Flammarion.
- Singleton, P. (1999). *Bactériologie, 4^e édition*. DUNOD .
- SOUZA, C. K. (1995). EVALUATION DES PROPRIETES ANTIMICROBIENNES DES EXTRAITS AQUEUX TOTAUX DE QUELQUES PLANTES MEDICINALES . *pharm. Méd. tra. afr*, 103-112.
- Stephanie Rolsma, D. W. (2015). 5 – *Pseudomonas aeruginosa* toxins. *The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins (Fourth Edition)*, 133–160.
- Sukhdev Swami Handa, S. P. (2008). *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*.
- Szapiro-Manoukian, N. (2011). E. Coli, un microbe rare transmis par les ruminants . *LE FIGARO* .
- téchnologies, f. I. (2015). *Le Néflier d'Allemagne Mespilus Germanica*. Allemagne : DUBO Laetitia L3SVB .
- Timothy J. Foster, J. A. (2015). Chapter 37 – *Staphylococcus aureus* . *Molecular Medical Microbiology (Second Edition)*, 655–674.
- Xavier Bertrand, C. S. (2011). Épidémiologie des infections à *Pseudomonas aeruginosa*. *RFL - Revue francophone des laboratoires*, 35-40.