REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

CENTRE UNIVERSITAIRE DE JIJEL

INSTITUT DES SCIENCES DE LA NATURE

الجمهورية الجزائرية الديموقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

المركز الجامعي جيجل

معهد العلوم الطبيعية

Mémoire
De Fin d'Etude en vue de l'Obtention du Diplôme
d'étude supérieure en biologie
Option MICROBIOLOGIE

Thème

EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE ET ANTIFONGIQUE DE L'EXTRAIT DE LA PLANTE « Ranunculus repens L »

Présenté par:
CHIKH Nacia Amel
LAHOULOU Madiha

Encadré par:
Mme ROULA Sadjïa

Année universitaire **2000/2001**

N° d'ordre:

Remerciements

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

Nous remercions Monsieur CHAIBEDDRA YASSINE qui nous a énormément aidés au cours de l'accomplissement de ce travail.

Nos remerciements vont au personnel du laboratoire d'hygiène de Jijel.

Nos remerciements vont aux membres du jury pour nous avoir honorés en acceptant de juger notre travail.

Que l'ensemble des enseignants qui ont contribué par leurs dévouements et leurs compétence à notre formation acceptent nos remerciements les plus sincères.

Que le personnel de la bibliothèque du centre universitaire de jijel trouve ici le témoignage de notre reconnaissance pour la documentation qu'il a bien voulu mettre à notre disposition.

Nos remerciements à tous ceux qui nous ont témoignés un soutien moral inégalable lors de la réalisation de ce travail.

Enfin « un grand merci » s'adresse à nos collègues qui nous ont tellement supportés tout au long de la période de notre formation.

LAHOULOU madiha

CHIKH nacia amel

promotion **2001**

DEDICACE

Je dédie ce modeste travail

A ma très chère Maman (AZIZA) qui ma permis de devenir se que je suis actuellement .

A mes très chers parents (Papa, Nachida)

A mon très cher mari (Nasser)

A mon frère et mes chères sœurs : Azim , Anita , et Assila .

A mes beaux-parents

A toute ma famille

A ma très chère amie Madiha

A tous les membres de l'association **ASTRA**

A toutes mes amies (is) fidèles

Nacia Amel

Dédicace

Je dédie ce modeste travail

- *A mes très chers parents (papa Smain, maman Fatma Zohra)*
- *A mes chèrs frères et mes chères sœurs : Abderrahim, Nadjib, Sameh, Riada.*
- *A toute ma famille et spécialement ma cousine Aïda.*
- *A ma très chère amie Nacia.*
- *A toutes mes amies (is) fidèles.*

Madiha

Table des matières

Pages

Introduction 1

Analyse bibliographique

I. GENERALITES SUR L'EMPLOI DES PLANTES MEDICINALES 3
II. LES RENONCULES 3
II.1. GENERALITES ET CLASSIFICATION 3
II.2. FAMILLE : RANUNCULACEAE 3
II.3. GENRE : RANUNCULUS 4
• LE PRINCIPE ACTIF ET ACTION 4
• EMPLOI EN PRATIQUE POPULAIRE 4
a. ESPECE : RANUNCULUS BULBOSUS 4
b. ESPECE : RANUNCULUS ACRIS 5
c. ESPECE : *RANUNCULUS REPENS L* 5
C.1 SYSTEMATIQUE DE *RANUNCULUS REPENS L* 6
C.2 LES EFFET INDESIRABLES DE *RANUNCULUS REPENS L* 7
III. PRINCIPE ACTIF ELABORE PAR *RANUNCULUS REPENS L* 7
IV. LES ANTIBIOTIQUES 8
IV.1 PRINCIPAUX ANTIBIOTIQUES CLASSES SELON LEURS MODES D'ACTION 9
IV.2 RESISTANCE 9
IV.3 SENSIBILITES 9
IV.4 TECHNIQUE DE MESURE : ANTIBIOGRAMME 10
V. LES ANTIFONGIQUES 10
V.1 ANTIFONGIQUES NATURELS 10
V.2 ANTIFONGIQUES DE SYNTHESE 10
V.3 RESISTANCE FONGIQUE 11
V.4 MESURE DE L'ACTIVITE ANTIFONGIQUE 11
VI. GENERALITES SUR LES GERMES TESTES 11
VI.1 FORME COCCOÏDES 11
a. STAPHYLOCOCCUS AURENS 11
b. STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS 12
c. STREPTOCOQUE DU GROUPE D 12
VI.2 LES FORMES BACILLAIRES 12
a. ESCHERICHIA COLI 12
b. ENTEROBACTER AGGLOMERANS 13
c. KLEBSIELLA PNEUMONIA 13
d. CITROBACTER DIVERSUS 14
e. PROTEUS MIRABILIS 15

f. PSEUDO AEROGENOSA 15
g. CLOSTRIDIUM PERFRINGENS 16
VI.3 LEVURE
CANDIDA ALBICANS 16

Matériels et méthodes

I. OBJECTIF 18
II. METHODE DE TRAVAIL 18
II.1 PREPARATION DE L'ESTRAIT DE PLANTE FRAICHE 18
II.2 PREPARATION DE L'ESTRAIT DE PLANTE DESSECHEE 18
II.3 PREPARATION DES SUSPENSIIONS BACTERIENNES 19
a. PRELEVEMENT DES ECHANTILLONS 19
b. ISOLEMENT ET IDENTIFICATION 19
II.4 EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE 20
a. TEST DE DILUTION 20
b. TEST DE DIFUSION 21

Résultat et discussion

I. RESULTAT 24
II. DISCUSSION 26

Conclusion

..... 28

Annexes

ANNEXE 1 30
ANNEXE 2 32
ANNEXE 3 33

Bibliographie

..... 37

Introduction

La médecine populaire, tout particulièrement dans nos compagnes, utilise toujours largement les plantes médicinales et la consommation à l'officine, aussi bien qu'à l'hôpital est également très importante.

Selon la pensée de Pasteur : « La chose était connue de toute antiquité il y manquait la consécration scientifique » Et comme le faisait remarquer le Dr Leclerc, en parlant de la médecine par les plantes : « Elle est passée du domine de la paléontologie médicale dans celui de la pratique journalière ».

C'est particulièrement évident, si l'on est du courant des recherches qui sont poursuivies actuellement dans les grands laboratoires, sur les constituants et principes végétaux susceptibles de fournir de nouveau produits actifs.

C'est dans le cadre d'une véritable collaboration avec la nature, dans le souci de compléter l'arsenal thérapeutique moderne, que se situe ce travail, construit non plus sur des bases empiriques mais, plus rationnellement, sur l'édifice scientifique constitué par tous ceux qui ont contribué au renouveau de cette thérapeutique millénaire, qui a fait ses preuves.

Parmis les plantes dites médicinales utilisés dans la région de Jijel, « *Ranunculus repens L* », sur laquelle le travail rapporté ici, consiste à tester les extrait de cette plante encore fraîche et desséchée sur des germes en culture, in vitro, pour déterminer une éventuelle activité antimicrobienne.

ANALYSE

BIBLIOGRAPHIQUE

I. GÉNÉRALITÉS SUR L'EMPLOI DES PLANTES MÉDICINALES

II. LES RENONCULES

III. PRINCIPES ACTIFS ÉLABORÉS PAR *RANUNCULUS REPENS L*

IV. LES ANTIBIOTIQUES

V. LES ANTIFONGIQUES

VI. GÉNÉRALITÉS SUR LES GERMES TESTÉS

I. GÉNÉRALITÉS SUR L'EMPLOI DES PLANTES MÉDICINALES

L'action des différentes plantes médicinales est due à certains composants élaborés par la plante appelés : " Principes actifs " et tout composant n'ayant pas d'action est dit inerte " gangue-végétale ". L'exemple du tannin isolé de la tormentille que l'on pensa remplacer les drogues a tannin. On a découvert que la plante médicinale possède une action plus complète et le principe actif extrait et soigneusement préparer était plus efficace que la drogue.

En médecine populaire, on utilise soit la plante toute entière ou une de ses parties. On ne connaît pas encore les principes actifs de certaines drogues, car on a pas pu les isoler et déterminer leurs propriétés chimiques bien que l'on connaît au moins en partie l'activité de la drogue naturelle.

L'utilisation des plantes médicinales en médecine populaire a donné une surestime à leur action, en leurs attribuant des propriétés que ne peuvent justifier leurs constituants chimiques. Car l'emploi des plantes ne peut guérir la tuberculose et les maladies vénériennes. Par contre on peut soutenir leur action dans le refroidissement d 'inflammation des muqueuses de la bouche du larynx, trouble de la digestion, elle peut rendre services dans certaines éruptions cutanées.

Donc le traitement par les plantes médicinales soutient le traitement lors de prescrit par le médecin [1].

II. LES RENONCULES

II.1 GÉNÉRALITÉ ET CLASSIFICATION

Les fleurs de la renoncule sont l'objet d'une activité horticole, ils sont cultivés pour la production florale serte ils sont moins rechercher que les anémones.

La renoncule est une plante herbacée bulbeuse dont la souche est dénommée «griffe ».

II.2. FAMILLE : RANUNCULACEAE

Plantes généralement herbacées, il y a quelques lianes ligueuses (clématites) et des arbustes (pivoines).

- Feuilles alternées, souvent très découpées.
- Fleurs solitaires en inflorescence de diverses sortes presque toujours très visibles, fleurs hermaphrodites à sépales et pétales parfois peu distincts ou insérés de façon similaire en une vertille étamine, très nombreux ovaires constitués de nombreuse carpelles non soudés entre eux donnant des fruits à kenoïdes, quelques fois pulmeux ou bien évoluant

en follicules contenant de nombreuses graines qui possèdent deux cotylédons (phylum : Dicotylédone) se caractérise aussi par l'absence des glandes sédiocés d'essépices. [03]

II.3. Genre : Ranunculus

Appelé aussi bouton d'or, en latin : Ranunculus veut dire " grenouille ", ils ont en générale des fleurs en jaune brillant et les espèces aquatiques sont à fleurs blanches.

Principe actif et action

Les feuilles et les tiges des plantes fraîches de toutes les espèces de renoncules contiennent une quantité variable d'une substance très irritante " anemonuole " qui du séchage se transforme en une substance moins active " anemonie " et toutes les renoncules séchées perdent leur agressivité, mais elles perdent en même temps les principes actifs qui les caractérisent.

En frottant la peau avec des parties de la plante fraîche, il apparaît une vive rougeur locale, il se forme plus tard des ampoules contenant de l'eau.

Selon une pratique populaire elle aurait une action fébrifuge et anti-inflammatoire dans l'angine et les inflammations de la bouche et de la gorge.

Cette action demande à être vérifier.

Emploi en pratiques populaire

On se sert des renoncules les plus irritantes pour frictionner la peau et combattre par cette révulsion, le rhumatisme et on l'utilise en cataplasme préparer après avoir hacher les bouton d'or frais et placer le bouillie obtenu dans une gaze stérile, ensuite l'appliquer sur le calconéum de la jambe malade, peu de temps après se reformera une ampoule importante et la douleur augmentera, quand elle devient insupportable, enlever le cataplasme, crever l'ampoule et laver avec l'acide borique (acide oxygéné dérive du bore H_3BO_3) [10].

A. espece : Ranunculus bulbosus

Habitat :

Plante spontanée, répandue dans les prairies et les herbeux secs et chauds de la pleine au pied des montagnes.

Période de récolte :

Au début de la floraison vers la fin du printemps et tout l'été.

Partie à utiliser :

Plante fraîche tout entière.

PROPRIÉTÉS THÉRAPEUTIQUES : RANUNCULUS BULBOSUS

Comme toutes les renonculacées contient des " protoanemonie " qui la rend vénéneuse de telle sorte qu'elle provoque au contact de la peau une forte irritation et dans les plus graves provoque de profondes ulcérations.

On l'utilisait en cataplasme de plante fraîche pour soigner la sciatique, le traitement était efficace, mais les conséquences douloureuses pour la peau ont fait abandonner cette pratique. Actuellement les homéopathes l'utilise sous différentes dilutions pour soigner les nefralgites intercostales, l'arthritisme, la goutte, les rhumatismes, les adhérences de la plèvre, l'herpès zostère, les douleurs aiguës aux yeux ou le long des parcours des nerfs, car cette plantes contient des alcaloïdes (morphine et codéine ...) qui ont un effet apaisant sur les douleurs.

B. RANUNCULUS ACRIS

Plante vivace pubescente de 25 à 75 cm, fruits à tête arrondie, variable, différente du renoncule bulbeux qui est la plus pubescente, par ses sépales dressés ou étalés, et de la renoncule rampante par l'absence de stolons, et des deux espèces pour son inflorescence plus fournie et ses pédoncules non sillonnées.

HABITAT : prairies fraîches de la pleine à l'étage montagnard.

PROPRIÉTÉS THÉRAPEUTIQUES : on l'utilise rarement par voies externes en cataplasmes dans les myalgies du nerf sciatique de saveur acre, on la dit vénéneuse à cause du principe actif appelé " camphre de renoncule " présent dans toute la plante [11].

C. Ranunculus repens

Ou renoncule rampante, ressemble à une renoncule bulbeuse à port couché, mais s'en distingue par ses sépales dressés ou étalés et par ses nombreux stolons radicants, ceux-ci peuvent être cachés par l'herbe.

HABITAT : endroits piétinés et humides des forets, jardins, plantation a terre rapportée, terrains vagues.

DESCRIPTION :

1. **Description de la semence :** Dimension 2,0 x 2,0 à 3,5 mm

   Couleur : Jaune – brun.

Forme : Lenticulaire (un côté plus bombé que l'autre) marginée à bec grêle en crochet de 0,5 à 1 mm.

Ornementation : Paroi verruqueuse.

Fruit contenant les graines : Akène.

2. **Description de la plantule :** Cotylédons allongés en forme de cuillère. Feuilles divisées, palmées.
3. **Description de la plante adulte :**

- Hauteur : 30 à 40 cm.
- Tige florifère ascendante, plusieurs fois divisées, sillonnée.
- Feuilles velue, radicales longuement pétiolées, tripartites, lobes eux-mêmes profondément divisés, lobe médian à long pétiolules. Feuilles caulinaires supérieurs petites presque sessiles.
- Fleurs jaunes, isolées, terminales, sépales dressés.
- Fruit ovale, lise, à bec court (2,5 à 3,5 x 2 à 3 mm).
- Plante toxique à l'état frais.
- Type biologique : vivace à stolons. [08]

C.1 SYSTÉMATIQUE DE *RANUNCULUS REPENS L*

Phylum : Dicotylédone.

Famille : Ranunculaceae

Ordre : Ranale ou polycarpique.

Genre : Ranunculus.

Espèce : Ranunculus repens.

Nom arabe : Mergheris.

Nom commun : Renoncule rampante.

Synonymes du nom commun :

Bouton d'or, bassinet, piepou pied de poule.

Noms communs dans d'autre pays :

Angletaire : creeping buttercup.

Italie : anuncolo strisciante.

Allemagne: riechender hahneufu. [08]

C.2 Les effets indésirables de *Ranunculus repens L*

L'extrait aqueux de cette plante a été longtemps utilisé dans le traitement traditionnel du cancer et de la gangrène par voies orale et cutanée sans toute fois apporter de preuves scientifiques sur sont efficacité et sa toxicité.

Des travaux de recherches ont été effectuer dans ce contexte et ont montrer que le *Ranunculus repens L* peut être utilisée dans les traitements locaux, mais elle risque d'aggraver une pathologie anticancéreuse lorsqu'elle serait utilisée par voie orale. [05]

Tableau récapitulatif :

Origine du Nom	Le nom du genre signifie petite grenouille car certaines espèces vivent dans des endroits marécageux.
Description	Plante de 20 à 50 cm. Fleurs jaunes de 2 à 2,5 cm de diamètre, isolés à l'aisselle des feuilles. Se reconnaît facilement par ces tiges stolonifères qui s'enracinent aux nœuds.
Cycle	Plantes pérenne se multipliant par stolons. Floraison de mai en juillet.
Habitat	Très commune, se rencontre dans les lieux ombragés et suffisamment humides (prairies, jardins, chemins) jusqu'à 2300 m d'altitude.
Médecine	Plante caustique qui peut provoquer des brûlures buccales si elle est mâchée.

Tableau 01

III. Principes actifs élaborés par *Ranunculus repens L*

Les plantes contiennent une infinité d'éléments actifs pouvant calmer les irritations et renforcer les parois capillaires tout en favorisant l'élimination des toxines ou en combattant l'infection.

Parmis les principales familles des substances actives élaborées par ***Ranunculus repens L*** ont peut citer :

LES ALCALOÏDES :

Ce sont des substances organiques (métabolites secondaires) composés de carbone, d'hydrogène, d'oxygène, d'azote et parfois de soufre.

Généralement extraites des dicotylédones, ils sont faciles à identifier et à isoler, avec un caractère nettement alcalin très actif, agissant à faibles doses, ils peuvent devenir très toxiques à fortes doses. On les trouve principalement chez les dicotylédones des pays chauds :

Ranales et ***Rubiacées***.

Tous les organes de la plante peuvent en contenir.

Leurs propriétés physiologiques sont très diverses, certains ont une action sur le système nerveux, d'autre agissent sur le système circulatoire et sur l'appareil respiratoire. Beaucoup sont utilisés par l'industrie pharmaceutique comme principes actifs ou comme modèles structuraux. [12]

LES FLAVONOÏDES :

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires se trouvant dans ***Ranunculus repens L*** sous formes de pigments (flavonoïdes vient du mot flavus : jaune). Ce sont des composés hétérosidiques, groupe particulier à l'intérieur de la classe des hétérosides.

De nos jours les propriétés des flavonoïdes sont largement étudiés dans le domaine médicale où on leurs reconnaît des activités antivirales, anti-allergiques et anticancéreuses.

Ils sont présents dans les plantes exerçant un effet bienfaisant et anti-inflammatoire sur le système circulatoire. [13]

Les Protocoles d'Extractions des alcaloïdes et flavonoïdes sont détaillés dans l'annexe 03

IV. LES ANTIBIOTIQUES

Les antibiotiques sont des métabolites secondaires qui ont une action bactériostatique ou bactéricide sur les bactéries et même d'autres germes. Les antibiotiques peuvent être un produit élaboré par les micro-organismes tel que les champignons, bactéries et actinomycètes, ils sont aussi produit de synthèse dans les industries pharmaceutiques.

On les a classer selon leurs modes d'action sur le micro-organisme qu'ils agissent sur la paroi, la membrane, acide nucléique, protéine, comme ont peut trouver les antibiotiques qui agisse à large spectre c'est-à-dire qu'il touche un nombre important de micro-organisme (ex : Virus, parasites, bactéries), alors qu'on trouve d'autre à spectre d'action restreint c'est-à-dire qu'il agit spécifiquement soit sur un seul type de micro-organisme (ex : Bactérie) ou même une famille de bactérie (spectre très étroit).

Mais actuellement la classification des antibiotiques est basée sur leurs compositions chimiques par exemple classe des β-lactamine, sulfamide, céphalosporine . [06]

IV.1 PRINCIPAUX ANTIBIOTIQUES CLASSÉS SELON LEURS MODE D'ACTION

Mode d'action	Antibiotiques	
1. Inhibition de la synthèse de la paroi	Pénicilline Bacitracine Novabiocine Cyclocerine	Vancomycine Ristocetine Greseofluvine Fosfomycine
2. Action sur la membrane	Polypeptides basiques. Polymexine. Bactéracine.	
3. Réplication de l'ADN	Thyrothricine. Mitomicine. Quinolone.	
4. Transcription de l'ADN	Actinomycine. Novabiocine.	
5. Traduction de l'ARN Synthèse des protéines a). Inhibition de la synthèse b). Anomalie dans la lecture du code	 Macrolides, Synergistines, Lincomicines, tetracycline, Chloromphénicol, fucidine. Nitromidazoles, Aminocides.	

TABLEAU 02

IV.2 RÉSISTANCE

La résistance est un phénomène qui indique que l'antibiotique n'a pas d'effet sur le micro-organisme ceci se traduit par le fait que le micro-organisme pousse même en présence de l'antibiotique.

L'expression de la résistance vis-à-vis de celui-ci peut être modifier génétiquement au niveau du plasmide.

IV.3 SENSIBILITÉ

La sensibilité d'un micro-organisme vis-à-vis l'antibiotique est très important puisqu'il constituera l'antibiothérapie, il est plus important de connaître l'antibiotique approprié au germe responsable pour une action plus efficace.

IV.4. TECHNIQUE DE MESURE (ANTIBIOGRAMME)

L'antibiogramme est une méthode analytique qui permet de mettre en évidence l'action de l'antibiotique sur le germe. Cette méthode se définit par la mesure de la zone d'inhibition diffuse par le disque d'antibiotique. On parle de sensibilité du germe s'il y a une présence d'une auréole autour du disque et son diamètre est inclus dans l'intervalle de référence.

La résistance du micro-organisme s'interprète par l'absence de l'auréole c'est-à-dire la pousse bactérienne tout autour du disque. [06]

V. LES ANTIFONGIQUES

Les antifongiques sont des métabolites doués d'action soit fongistatique ou fongicide et parfois les deux en même temps qui diffuse dans les tissus, et facilement administrable.

Certains antifongiques ne sont pas aussi bien toléré in vivo comme ils le sont in vitro ceci est du à la toxicité ou à la mauvaise diffusion de l'agent antifongique, pour dire qu'un agent antifongique est actif il doit d'abord traverser la paroi cellulaire.

Le fait que certain agent antifongique ne sont pas actif in vivo est due à une maladie fongique profonde. exemple : Des zones peu vascularisées comme les tissus nerveux qui peuvent être agresser par " *Cryptcoccus neoformans* ".

Parmis les méthodes les plus efficaces reste l'amphotericine B intraveineuse, qui est soutenus depuis longtemps comme thérapie antifongique.

Tous comme les antibiotiques, les antifongiques existent sous deux sortes, la première est naturelle c'est-à-dire un produit de micro-organisme (actinomycète) et d'autre sont de synthèse des produit d'industrie spécialisé (pharmaceutique).[02]

V.1 LES ANTIFONGIQUES NATURELS

Plusieurs micro-organismes sont inclus dans la production mais ont parle des actinomycète pour les poluènes comme nystatine amphotericene B connu pour une action antifongique à large spectre qui s'étend sur (levure, candida, cryptococcus, histoplasma ...) champignon dimorphique comme le pénicilline greseofluvium qui produit des greseofluvine

dont l'action réduite par rapport au poluène, il y a aussi saramycitine son spectre d'action est très étroit et se limite sur les champignons dimorphiques.

V.2 Les antifongiques de synthèse

- Iodure de potassium IK
- Sulfamide S
- 5 fluorocytosine 5 FC
- dérivé de l'imidazol : clotrimazole ...[04]

V.3 Résistance fongiques

La résistance fongique est un phénomène traduit par la pousse des champignons en culture même en présence d'agent antifongique, comme on peut l'observer par le retour de la mycose après traitement (retour du même champignon).

V.4 Mesure de l'activité antifongiques

La mesure de l'action antifongique peut se faire soit par un test de l'activité thérapeutique soit en testant sur des souches isolées avant et pendant le traitement, c'est une sorte d'étude comparative. [7]

VI. GENERALITES SUR LES GERMES TESTES

Parmis tout les germes entourant notre environnement nous avons testé des souches pathogènes isolées de différent prélèvement : Urine, pus, LCR, spermes, prélèvement vaginale, selles, l'eau.

VI.1 Forme coccoïdes :

A. *Staphylococcus aureus*

Habitat : Le staphylococcus auréus fait partie de la flore normale, il peut se trouver dans les fosses nasales, il peut être également isolé des selles.

Morphologie : le nom de staphylococcus a été crée par Ogston pour décrire ces graines *" KOKKOS "* groupe en amas irrégulier d'une façon a formé une grappe de raisin.

Et en 1884 Rosenback les a classées selon la substance excrétée lors de sa culture il a nommé staphyloccocus aurens pour le staphylocoque doré.

Caractère bactériologique :

Urease	Nitrate	VP	Saccharose	Glucose	Mannitol	Coagulasse	Lac	Phosph.
−	+	+	+	+	+	+	+	+

ENZYME ET TOXINE :

- Betalactimase
- Staphylokinase
- Staphylococcine

Parmis les infections les plus fréquemment causé par ce germe :

Septicémie, infection amygdale, sinusite.

B. STAPHYLOCOCCUS ÉPIDERMIDIS

HABITAT :

Le Staphylococcus epidermidis fait aussi partie de la flore normale, il a été isolé au niveau de la peau surtout, les muqueuses, les orifices naturels.

MORPHOLOGIE :

Peau surtout le *Staphylococcus epidermis* est aussi sous forme de grain regroupé en amas irrégulier qui donne une sorte de grappe de raisin, cette morphologie a été décrite par Ogston, leur couleur est blanche.

CARACTÈRE BIOCHIMIQUE

Urease	Nitrate	Glucose	Lactose	Saccharose	Coagulase	Phosph.	Manitol
+	+	+	+	+	-	+	-

Les infections fréquemment et principalement cause sont :

- Infections urinaire, endophtalmie (après chirurgie)
- Maladie opportuniste des immunodéprimé.

C. STREPTOCOQUES DU GROUPE D

Les streptocoques sont ubiquitaires, on peut les retrouver en milieu extérieur dans les eaux ou dans les aliments, et qui sont preuves d'une contamination fécale d'origine humaine ou animale.

MORPHOLOGIE :

Ce sont des coccis Gram positif sphérique ou ovoïde disposé en paire pour forme des diplocoques et peuvent se présenter sous forme de chaînette parfois longue mais non sporulé.

TEST DE PRÉIDENTIFICATION

Hemolyse	+
Bacitracine	R
Optochine	R

Parmis les principales infections induites :

Infection urinaire

VI. 2 FORME BACILLAIRE : LES ENTÉROBACTÉRIES

A. ESCHERICHIA COLI

HABITAT :

Escherichia coli est une Entérobactérie qui fait partie de la flore commensal de l'intestin de l'homme et des animaux.

PATHOLOGIE :

Elle cause des infections urinaires et chez les enfants des gastro-entérites infantiles.

MORPHOLOGIE :

Escherichia coli est une Entérobactérie forme de bacille Gram négatif aérobie anaérobie facultatif pousse abondamment sur milieu gélose ordinaire.

CARACTÈRES BIOCHIMIQUES

Urease	Indol	Glucose	Lactose	Saccharose	CO_2	H_2S	Citrate	Ox.	ONPG
-	-	+	+	+	–	-	-	-	+

ENZYME ET TOXINE :

Colicine : connu pour la pathologie gastro-entérite infantile GEI et infection urinaire.

B. ENTEROBACTER AGGLOMERANS :

HABITAT :

Enterobacter sont des bactéries commensales du tube digestif de l'homme et des animaux, retrouvé dans l'eau, sur les sols, sur la peau, et les muqueuses et même réputé à l'origine des infections nosocomiales.

MORPHOLOGIE :

Bacille Gram négatif on les distingue par leur mobilité et certain caractère biochimique.

CARACTÈRE BIOCHIMIQUE :

Mobilité	ODC	ADH	Urease	LDC	VP	Indol	H_2S
+	-	-	-	-	+	-	-

Enterobacter agglomerans responsable de plusieurs infections, les principales sont : Infection urinaire, septicémie méningé et aussi connu comme à l'origine des maladies opportunistes.

C. KLEBSIELLA PNEUMONIAE :

HABITAT :

Klebsiella pneumoniae est une espèce rencontrée le plus souvent dans les eaux, les végétaux, et sur le sol. Isolé de la flore fécale de l'homme, est fréquente dans les muqueuses et commensal de la peau et des voies respiratoires.

MORPHOLOGIE :

Ce sont des Entérobactéries toujours immobiles possédant généralement une capsule. Bacille Gram négatif.

CARACTÈRE BIOCHIMIQUE :

UP	ONPG	LDC	Indol	Malonat	Ure.	Glu.	Sacc.	Gaz	Mant.	Mob.
+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-

Ce genre peut développer une infection urinaire, et une broncho-pneumopathie aiguë.

D. CITROBACTER DIVERSUS :

HABITAT :

Le ***Citrobacter diversus*** entérobactérie commensal du tube digestif des hommes et des animaux à sang chaud (vivant).

On peut les isolés du sang et des eaux trouvées dans l'environnement, il peur être isolé également d'urine, selles ou de suppuration diverse.

MORPHOLOGIE :

Citrobacter diversus *est une* Entérobactérie Mobile, Bacille Gram négatif cette Bactérie Possède Plusieurs souches atypiques par rapport au caractère biochimique.

CARACTÈRES BIOCHIMIQUES :

Cit.	Ure.	TDA	Indol	Nit.	Manitol	LDC	H_2S	ONPG	Lac.	Gaz	Glu.	VP
+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-

Développe des infections urinaires et des diarrhées sévères.

E. PROTEUS MIRABILIS :

HABITAT :

C'est une Entérobactérie répondue dans l'environnement, retrouvée sur le sol, dans les eaux de surface, les eaux d'égout, considéré comme hôte habituel du tube digestif des hommes et des animaux.

MORPHOLOGIE :

Proteus mirabilis sont des Bacilles très polymorphes dans une culture jeune on peut retrouver des formes courtes et des formes longues. Les souches très mobiles sont pourvues de long flagelle.

CARACTÈRES BIOCHIMIQUES :

H_2S	Ure.	Ind.	ODC	Man.	TDA	Mob.
+	-	-	+	+	+	+

Ce germe est principalement cause des infections urinaires.

AUTRES BACILLES

F. PSEUDOMONAS AEROGENOSA :

HABITAT :

C'est une bactérie saprophyte, retrouvée sur le sol humide, les végétaux, commensal aussi du tube digestif de l'homme et des animaux.

MORPHOLOGIE :

Bacille Gram négatif mobile par ciliature polaire non spoulé, bactérie réputée d'une résistance au antibiotiques, les bacilles sont fin de 0,5 à 1,3 µm et peuvent être entourés d'une pseudocapsule.

CARACTÈRES BIOCHIMIQUES :

Glucose	Lactose	Saccharose	Mobilité	Urease	Citrate	VP	RM	Indol
+	–	-	+	-	+	-	-	-

Pseudomonas aerogenosa est à l'origine des maladies opportunistes et aussi de quelques infection ORL.

G. Clostridium perfringens :

HABITAT :

Cette bactérie est retrouvée dans la flore intestinale aussi que quelque espèce animale, isolé des sols sous forme sporadique, sa présence ou celle de ses spores dans l'eau et les aliments est à l'origine d'une contamination fécale.

MORPHOLOGIE :

Bacille Gram positif, trapus à bord parallèle et à bout carré 1 µm sur 3 à 4 µm, immobile, peut se trouver isolé ou en forme de chaînette tout dépend du stade de croissance. Comme on observe des capsules dans les prélèvements pathologiques.

. Leur forme spoulé n'est observée que dans des milieux complexes.

CARACTÈRES BIOCHIMIQUES :

Mobilité	H_2S	Urease	Indole	Gelatinase	Glucose	Lactose	Saccharose	Mantol
-	+	+	-	+	+	+	+	+

Le ***Clostridium perfringens*** provoque en sa présence une intoxication alimentaire.

VI.3. Levure

A. Candida albicans

HABITAT :

C'est une levure qui fait partie de la flore commensal vaginale, comme on a pu l'isolé des eaux usées.

MORPHOLOGIE :

Le ***candida albicans*** est une levure de forme ovoïde à contour irrégulier, la forme de ces colonies est petite et blanchâtre.

Le ***candida albicans*** peut être à l'origine des infections à candidose urètro-génital, et parfois les vaginites. [09] [07]

جامعة دكتور الطاهر مولاي سعيدة
كلية علوم الطبيعة و الحياة
مكتبة الكلية

Matériels et Méthodes

I. Objectif

II. Méthode de travail

I. OBJECTIF

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

Notre travail vise à vérifier si l'extrait de la plante ***Ranunculus repens L*** a un effet inhibiteur sur différents germes.

II. METHODES DE TRAVAIL

Les travaux déjà fait sur l'extrait de la plante ***Ranunculus repens L*** desséchée n'ont pas donner de résultat significatifs, ceci est probablement dû au fait que les renoncules, une fois desséchées perdent leurs principes actifs.

Alors on a tenté de tester l'extrait de la plante desséchée et l'extrait de la plante fraîche en parallèle.

II.1 PRÉPARATION DE L'EXTRAIT DE PLANTE FRAÎCHE

L'extraction du principe actif de la plante ***Ranunculus repens L*** se fait après la récolte en mois de mai. On procède ensuite en plusieurs étapes :

Après avoir acheminer la plante fraîche récoltée vers le laboratoire.

- On fait peser une quantité de 50g de plante (toutes les parties : tiges, racines, feuilles...).
- On procède au broyage à l'aide d'un mortier en ajoutant 100ml d'éther de pétrole pour l'extraction du principe actif.
- On récupère la substance aqueuse obtenue après filtration et la faire passer dans le rota-vapeur pour l'évaporation de l'éther de pétrole.
- Le résidu de l'évaporation récupéré dissous dans de l'eau distillée (25ml).

On obtient l'extrait brut de la plante fraîche.

NB : Toute la préparation se fait dans les conditions de stérilité.

II. 2 PRÉPARATION DE L'EXTRAIT DE PLANTE DESSÉCHÉE

- Déshydratation totale de la plante (entière) dans l'étuve à 50° C. (referenle)
- Broyage sous forme de poudre fine récupérée après tamisage.
- **Extraction :** On laisse 50g de l'extrait en poudre tamisé dans 100ml d'une solution d'éther de pétrole pendant 24 heures, puis on procède à l'évaporation dans le rota-vapeur.

- On récupère le résidu sec et on le dissolve dans 150ml d'eau distillée : c'est l'extrait brut ou Tatum (totale des principes actifs). [14]

II. 3 PRÉPARATION DES SUSPENSION BACTÉRIENNE

A. PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS

Les prélèvements arrivent au laboratoire dans des tubes a essais ou des écouvillons, ils sont conservés selon les règles de stérilité afin d'éviter toute contamination. Ce sont des échantillons biologiques prélevés des malades (prélèvement vaginale, selles, pus, sang, LCR …).

B. ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES GERMES

ISOLEMENT : On ensemence différents milieux de cultures suivant le type de germe recherché comme suite :

- Ensemence sur milieu sélectif :

  Gélose BCP ⇨ pour les entérobactéries.

  Gélose Chapman ⇨ pour les Staphylocoques.

  Gélose Sabouraud ⇨ pour les levures et les champignons.

  Gélose au sang ⇨ pour les germes exigeants.

- Réalisation d'une coloration de gram à partir de le pousse afin de déterminer la morphologie du germe (cocci ou bacille).

IDENTIFICATION :

Les germes sont identifier à partir du milieu sélectif selon différents critères : Formes des colonies, couleur, galerie biochimique classique, test de filamentation sur sérum de chevale.

- Une fois les espèces isolées et identifiées, on les ensemence sur les tubes de la gélose nutritive inclinée.
- Pour la levure "***Candida albicans***" elle est ensemencée sur milieu gélose sabouraud.
- Les souches sont conservées au réfrigérateur à 4° C.
- Ces germes conservés sont ensuite ensemencés sur bouillon nutritif afin d'avoir une culture jeune (enrichissement) sur laquelle on procède à la détermination de l'activité anti-microbienne de l'extrait de plante.

CARACTÈRES BIOCHIMIQUES :

Le tableau suivant présente les caractères biochimiques de quelques germes utilisés dans notre étude.

Caractère biochimique / **Espèce**	Glucose / Glu.	Lactose / Lac.	Saccharose / Sac.	Mobilité / Mob.	Urease / Ure.	Citrate / Cit.	Voges Proskaur / VP	Rouge methyl / RM	Indole / Ind.
Escherichia coli	+	+	+	+	-	-	-	-	+
Enterobacter agglomérans	+	+	+	+	-	-	+	-	-
Proteus mirabilis	-	-	-	+	+	+	+	-	-
Klebsiella pneumonia	+	+	+	-	+	+	+	-	-
Pseudomonas aerogenosa	+	+	-	+	-	+	-	-	-
Citrobacter diversus	+	+	-	+	-	+	-	-	+

TABLEAU 03 : Caractères Biochimiques des germes utilisés.

II. 4 EVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTI-MICROBIENNE

A. TEST DE DILUTION

SUR MILIEU LIQUIDE :

On mesure l'activité anti-microbienne sur les bactéries dans un tube à essaie comme suit :

- Pour chaque genre de bactérie 3 tubes à essai contenant 5ml de bouillon nutritif.
- Nous mettons dans ces tubes 1ml, 2ml, 3ml, d'extrait de plante desséché donc un gradient de concentration.
- A partir d'une culture jeune, on ensemence les tubes.
- Incubation à 37° C pendant 24 heures.

NB : on refait la mêmes chose en utilisant l'extrait de la plante fraîche.

Sur milieu solide :

- On fait fondre la gélose Muller-Hinton au bain-marie.
- Sur les boites de pétrie, on met 2ml d'extrait de plante à l'aide d'une pipette graduée stérile et on ajoute la gélose fondue, on remue la boite de façon à avoir une gélose homogène. L'opération se déroule dans la zone stérile près du bec benzène.
- On laisse refroidir puis on ensemence dans chaque boite du germe.
- On marque sur les boites de pétrie le nom du germe ensemencer et celui de l'extrait utilisé (plante fraîche ou plante desséchée)pour ne pas confondre les résultats.
- Incubation à 37° C pendant 24 heures.

B. Test de diffusion

Principe :

Le test qualitatif de diffusion sur agar utilisé en pratique courante se fait ainsi :

- Imprégnation d'un disque de substance testé et le placé sur la surface d'une boite de pétrie contenant la gélose et préalablement ensemencée avec une culture de germes.
- Il y aura diffusion de la substance dans l'agar en réalisant un gradient de concentration décroissant autour du disque.
- Il y aura pousse des bactéries jusqu'à la limite où il y a une concentration inhibitrice de la croissance.
- On mesure le diamètre de la zone d'inhibition et qui dépend de plusieurs paramètres :
  - La concentration minimale inhibitrice de la bactérie testée.
  - La vitesse de croissance de la bactérie.
  - Le contenue du disque en substance antibiotique.
  - Standardisation de l'inoculum bactérie.

Préparation des disques :

- Sur le papier wattman on découpe des disques de 6mm de diamètre.
- Imprégnation des disques avec l'extrait de plante à l'aide de pipette pasteur et on laisse séché. On sépare les disques avec l'extrait de plante fraîche de ceux avec l'extrait de plante desséché.
- La préparation des disques se fait dans les conditions de stérilité

TEST DE DIFFUSION :

- Couler la gélose Muller-hinton sur les boites de pétrie et laisser refroidir.
- On fait une dilution des bouillons nutritifs contenant les germes, en mettant une goutte de celui-ci dans un tube à essai contenant 10ml d'eau distillée à l'aide d'une pipette pasteur, on homogénéise pour obtenir une suspension limpide.
- On ensemence chaque boite de Muller-Hinton avec un germe donné par la méthode d'étalement (en râteau) de telle sorte que toute la surface de la gélose soit ensemencée de manière homogène.
- On dépose les disques imprégnés de l'extrait sur la gélose ensemencée, en laissant un espace entre les disques.
- On dépose aussi un disque d'antibiotique auquel la bactérie est sensible, pour comparer les zones d'inhibition.
- On doit marquer aussi quels sont les disques déposés sur telle ou telle boite contenant tel ou tel germe (disque avec extrait de plante fraîche ou disque avec extrait de plante desséché).

Résultats et Discussion

I. Résultats

II. Discussion

I. RESULTATS

TEST DE DIFFUSION : Les Résultats obtenus à l'issu du test de diffusion de l'extrait de la plante fraiche et celui de la plante déssecheé sur les differents germes sont représentés dans le tableau 04.

Les germes	Disques		
	Extrait de plante desséchée	**Extrait de plante fraîche**	**Référence antibiotique**
▪ Staphylococcus aureus	-	-	Imipeneme
▪ Staphylococcus epidermidis	- (Zone négligeable) (≈ 8mm)	- (Zone négligeable) (≈ 8mm)	Viriginiamycine
▪ Escherichia coli	-	-	Gentamicine
▪ Enterobacter agglomerans		(Zone négligeable) (≈ 10 mm)	Imipeneme
▪ Klebsiella pneumonia	-	-	Colestine
▪ Citrobacter	-	- (Zone négligeable) (≈ 10 mm)	Imipenème
▪ Pseudomonas aerogenosa	-	-	Ticarciline
▪ Proteus mirabilis	- (Zone négligeable) (≈ 11mm)	- (Zone négligeable) (≈ 11mm)	Imipenème
▪ Clostridium perfringens	-	-	
▪ Streptocoque du groupe D	-	-	Penicilline
▪ Candida albicans	-	-	Trimethoprime + sulfamide

TABLEAU 04: Les Résultats du Test de Diffusion

Remarque :

On remarque qu'il y a un effet négligeable par rapport au disque témoin sur les souches ***proteus***, ***enterobacter agglomerans*** et ***Citrobacter diversus*** selon la méthode de diffusion des disques avec l'extrait de la plante fraîche.

TEST DE DILUTION SUR MILIEU LIQUIDE :

Le tableau 05, ci dessous est un récapitulatif des résultats du test de dilution sur milieu liquide.

Germes	Tube avec 1ml		Tube avec 2ml		Tube avec 3ml	
	Extrait desséché	Extrait frais	Extrait desséché	Extrait frais	Extrait desséché	Extrait frais
▪ Staphylococcus aureus	-	-	-	-	-	- neg
▪ Citrobacter diversus	-	-	-	-	-	-
▪ Escherichia coli	-	-	-	-	-	-
▪ Staphylococcus epidermidis	-	-	-	relativement limpide	-	limpide
▪ Pseudomonas aerogenosa	-	-	-	-	-	-
▪ Candida albicans	-	-	-	-	-	-
▪ Enterobacter agglomerans	-	-	-	-	-	-

TABLEAU 05: Les Résultats du Test de Dilution

REMARQUES :

Selon la méthode de dilution sur milieu liquide, on remarque que le tube avec 2ml de l'extrait de plante fraîche contenant le ***staphylococcus epidermis*** est relativement limpide.

TEST DE DILUTION SUR MILIEU SOLIDE

Une pousse de colonies sur toute la surface de la gélose pour toutes les souches testées et pour les deux extraits de plante.

SUR MILIEU LIQUIDE

Trouble visible dans les tubes à essai avec 1ml, 2ml, 3ml d'extrait de plante desséché pour toutes les souches.

TEST DE DIFFUSION

Colonies réparties sur toute la surface de la gélose et autour des disques imprégnés de l'extrait de plante desséchée.

- Par contre, il y a une zone négligeable autour des disques a l'extrait de la plante fraîche.
- Grande zone d'inhibition autour des disques d'antibiotiques témoins.

II. DISCUSSION

L'exploitation des plantes dans la préparation des antibiotiques est rare, mais n'empêche qu'elle semble un axe prometteur de recherche de substances bioactives vu l'apparition de nombreuses résistances rendant inefficace des antibiotiques contre certaines infections. Toute fois certains auteurs ont constaté une activité antibactérienne de certains extrait de plantes.

Dans notre travail, l'objectif est de rechercher une activité antibactérienne et antifongique à partir de l'extrait brut de ***Ranunculus repens L.*** de sélectionner ensuite les germes qui en sont sensibles et comparer l'effet de l'extrait obtenu de la plante fraîche et de celui obtenu de la plante desséchée sur les mêmes germes.

Les résultats de notre étude portée sur différentes souches bactériennes et fongiques, montrent que les espèces ***Proteus mirabilis*** et ***Citrobacter diversus*** manifestent une légère sensibilité envers l'extrait brut de la plante fraîche selon la méthode de diffusion des disques. ***Proteus mirabilis*** est aussi sensible à l'extrait de la plante desséchée.

On constate aussi que ***Staphylococcus epidermis*** est légèrement sensible à l'extrait de la plante fraîche selon la méthode de dilution sur milieu liquide. Ce qui pourrait être une preuve qui vérifie l'action efficace de l'extrait de la plante fraîche contre les infections cutanées en médecine traditionnelle.

Il est donc clair qu'il y a une activité plus significative lorsque l'extrait est obtenu à partir de la plante fraîche, et que la plante desséchée a moins d'effet.

En améliorant les techniques d'extraction et de purification des différentes substances actives de la plante ***Ranunculus repens L*** cela pourrai donner plus de chance à d'autres résultats plus prometteurs pour la mise au point de nouveaux antibiotiques.

Conclusion

Les Connaissances des anciens thérapeutes étaient loin d'être négligeables, car des milliers de traitements ont été expérimentés et parmis ceux-ci, les plantes se sont révélées dans la plupart des cas d'une efficacité et d'un secours inestimable de ce fait on prouve qu'il ne s'agit pas d'une innovation thérapeutique, mais d'une mise au point méthodique et Scientifique, basé sur les données souvent très anciennes, rénovées, complétées et précisées par les techniques scientifiques actuelles, en travaillant sur l'extrait de la plante,

Ranunculus repens L fraîche et desséchée in vitro pour évaluer son activité anti-microbienne. Les résultats les plus significatifs montrent une sensibilité de l'espèce *Staphylococcus epidemidis* à l'extrait brut de la plante.

Pour une meilleure évaluation de l'activité anti-microbienne on doit d'abord vérifier les Paramètres d'extraction et ceci pour mieux dominer l'action des différents principes actifs, Car non seulement les substances élaborées par les plantes sont infiniment variées, mais elles Sont bien mieux tolérées par l'organisme que les substances étrangères créées Synthétiquement dont on connais mal la toxicité à longue échéance et les effets accessoires et Comme le dit le *PROFESSEUR PARIS : « **ces substances sont mieux adaptées à L'organisme puisqu'elles sont le produit naturel d'une chimie de la vie** »,[F BARDEAU **La Médecine par les Fleurs de, édition 1978].***

Annexes

Annexe 1 Composition des milieux utilisés

Annexe 2 Coloration de gram et test de filamentation

Annexe 3 Schéma du protocole d'extraction des alcaloïdes et des flavonoïdes

Annexe 1

Composition des milieux utilisés :

1. Milieu de Chapman

1. Extrait de viande	1 g/l
2. Chlorure de sodium	75 g/l
3. Peptone	10 g/l
4. Gélose	15 g/l
5. Manitol	10 g/l
6. Rouge de phenol	0.025 g/l

2. Bouillon nutritif

1. Extrait de viande	5 g/l
2. Peptone pancreatique	10 g
3. Chlorure de sodium	10 gl

3. Milieu de gélose nutritive

1. Extrait de viande de bœuf	1 g
2. Extrait de levure	2 g
3. Peptone	5 g
4. Chlorure de sodium	5 g
5. Gélose	15 g

4. Milieu Muller Hinton

1. Infusion de viande de bœuf	300 g
2. Hydrolysate de coseines	75.5 g
3. Amudon	1.5 g
4. Gélose	10 g

5. Milieu gélose au sang

1. Extrait de viande de bœuf	1 g
2. Extrait de levure	2 g
3. Peptone	5 g
4. Chlorure de sodium	5 g
5. Gélose	15 g
6. Du sang du cheval ou du mouton	5%

6. Gélose Bromocresol Pourpre (BCP)

1.	Extrait de viande de bœuf	3 g/l
2.	Biopolytone	5 g/l
3.	Lactose	10 g/l
4.	Gélose	10 g/l
5.	Bromo-cresol pourpre	2.025 g/l

PH : 6.8

7. Gélose Endo

1.	Peptone	10 g
2.	Lactose	10 g
3.	Phosphate bipolastique	3.5 g
4.	Sulfite de sodium	2.5 g
5.	Fushine basique	0.5 g
6.	Gélose	15 g

PH : 7.4

8. Gélose Sabouraud

1.	Biopolutone	10 g/l
2.	Glucose	40 g/l
3.	Gélose	15 g/l

PH : 5.6

Annexe 2

1. Coloration de gram

La coloration de Gram nous permet de différencier deux principaux groupe de bactérie Celle à Gram positif et l'autre à Gram négatif par la couleur que prend la bactérie à la fin de la Coloration.

Technique de coloration

D'abord faire un bon frottis mince pour ne pas laisser condense le colorant (fausser les Résultats) ensuite en procède comme suit :

Mettre le violet de gentiane pendant 1 min et puis rincer, suivie de lugole pendant 1 min rincer, mettre l'alcool pendant 30 secondes rincer, enfin mettre la fushine pendant 1 min rincer et la faire sécher à feuille absorbante wattman, observation se fait à objectif x100 avec Une goutte de l'huile à immersion.

2. Test de filamentation

Le test de filamentation permet (d'identifier) de mettre en évidence l'espèce

Candida albicans sur milieu Sabouraud.

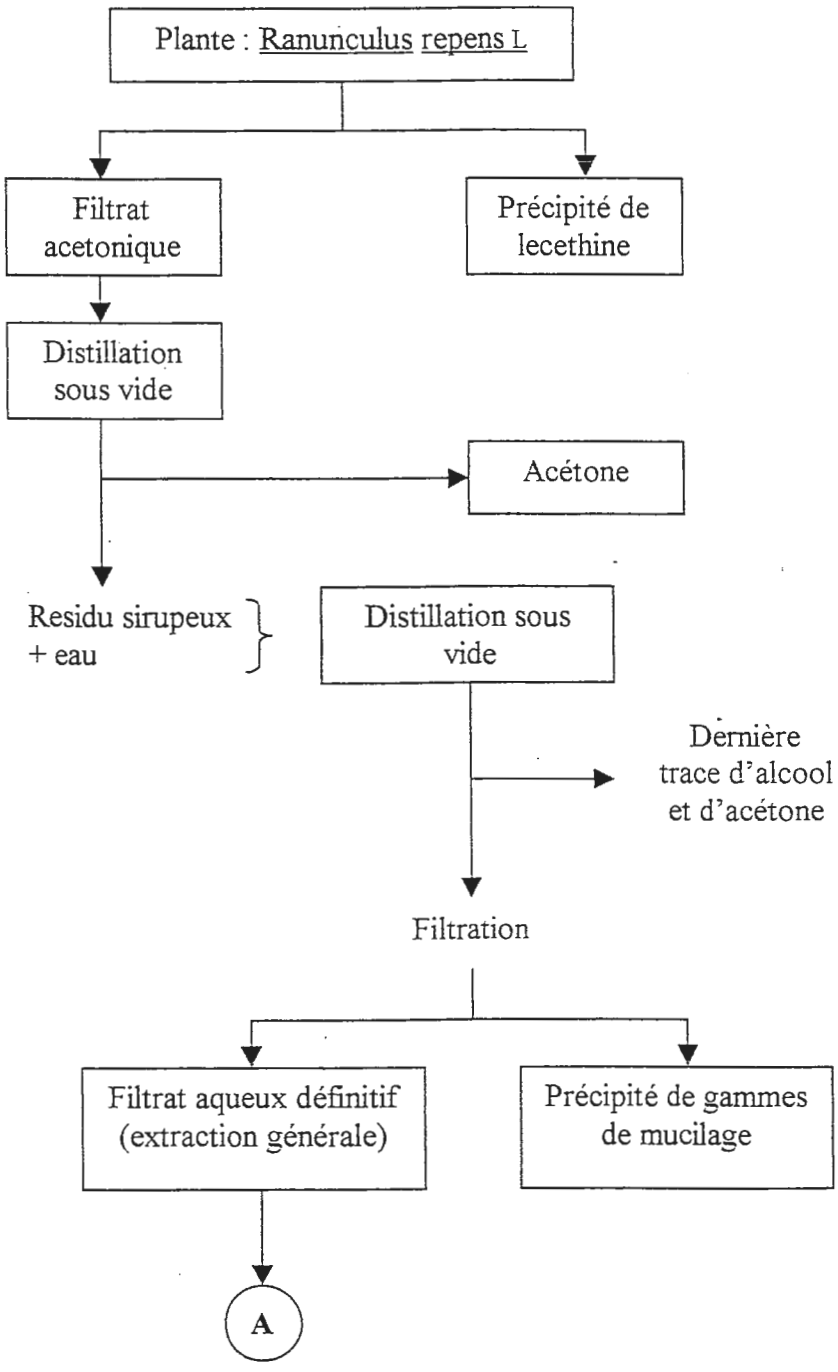
On ensemence un tube contenant 2 ml de sérum de cheval, incubé 24 heures à 37°C. L'observation se fait à l'état frais, les cellules de ***Candida albicans*** présente un

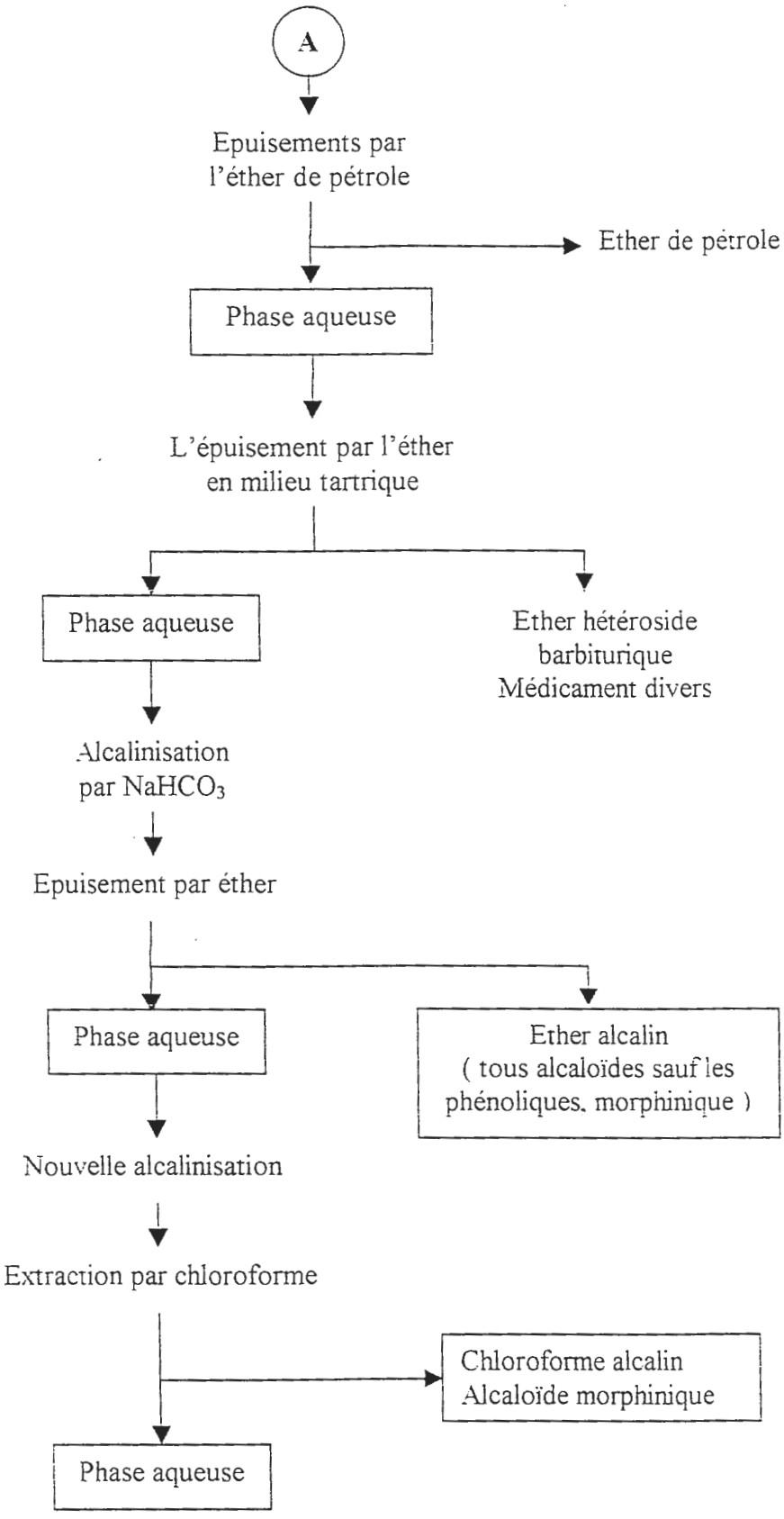
« Tube de germination » caractéristique de l'espèce.

Annexe 3

SCHÉMA PROTOCOLE D'EXTRACTION DES ALCALOÏDES

1. EXTRACTION GÉNÉRALE




A
Epuisements par l'éther de pétrole
Ether de pétrole
Phase aqueuse
L'épuisement par l'éther en milieu tartrique
Phase aqueuse
Ether hétéroside barbiturique Médicament divers
Alcalinisation par $NaHCO_3$
Epuisement par éther
Phase aqueuse
Ether alcalin (tous alcaloïdes sauf les phénoliques, morphinique)
Nouvelle alcalinisation
Extraction par chloroforme
Chloroforme alcalin Alcaloïde morphinique
Phase aqueuse

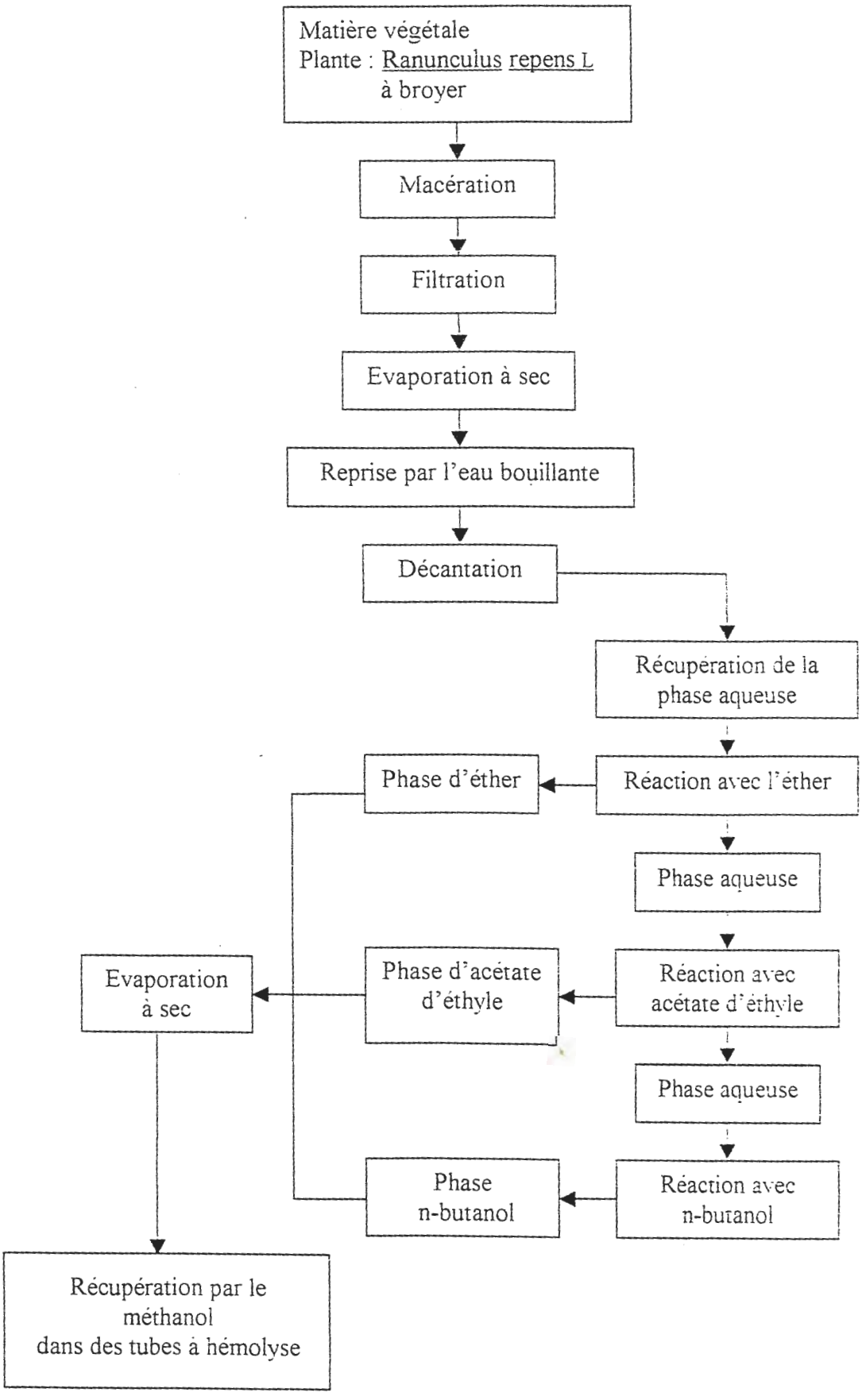
Les réactifs utilisés dans le protocole d'extraction des alcaloïdes sont les suivants :

1. l'éther acide
2. l'éther alcalin
3. chloroforme alcalin
4. solution de NaOH à 40%
5. papier tournesol (PH)
6. l'éther (éther de pétrole)
7. sulfate de sodium anhydre SO_4Na_2
8. solution de HCl à 10%
9. chloroforme

Pour le protocole de l'extraction des flavonoïdes dont le schéma est en ce qui suit, les réactifs utilisés sont les suivant :

1. méthanol
2. acétate d'éthyle
3. butanol [25]
4. soude urine amide
5. gel de cephadex
6. eau distillée

SCHÉMA PROTOCOLE D'EXTRACTION DES FLAVONOÏDES



Bibliographie

[1] ***DELACHON. X, MIESLE,*** petit Guide Panoramique des Herbes Médicinales.

[2] ***DUPONT B, DROUCHET E,*** Antifongique.

[3] ***FILTER R, DAVID M, TOCH G,*** Guide des plantes à fleurs : ***3ème Edition.***

[4] ***HART T., SHEARS P.,*** Atlas de Poche de Microbiologie, Edition Flammarion 1997.

[5] ***LAHOUAL M.,*** Compte Rendu du Simminaire National sur les Plante Médicinale.

[6] ***LECLERC H, IZARD D,*** Microbiologie générale : Edition 1992.

[7] ***LECLERC H, MOSSEL D,*** Microbiologie du tube digestif de l'eau et des aliments : Edition 1989.

[8] ***J-P LONCHAMP*** nov. 2000.

[9] ***MONTEIL H.,*** *DENIS F., DEBERNAT. H,* J-L Avril, Bactériologie clinique

[10] ***POLETTI. A.,*** Fleurs ET plantes médicinales: Edition 1982 ***Tome 1.***

[11] ***POLETTI. A.,*** Fleurs et Plantes médicinales: Edition 1982 ***Tome 2.***

[12] Email : ***terre. Des Plantes. @ mail. dot com.fr*** le brin d'herbe N°18 été 2000 plante Et principe actif.

[13] ***Universalis*** : Article de l'encyclopédie Version 5.2.1 (2000) « **CD** » .

[14] ***ZELLAGUI A., Méthode d'Extraction des flavoïdes et alcaloïdes 2000.***

Thème

EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE ET ANTIFONGIQUE DE L'EXTRAIT DE LA PLANTE

« *Ranancalas repens L* »

Résumé

Le monde végétal a toujours susciter des recherches en matière de nouvelles molécules chimiques naturelles et pharmacologiquement actives. Des milliers de plantes en sont des sources peu exploitées.

En effet les chercheurs ont des possibilités de découvertes de nouveaux médicaments à partie de cette véritable mine naturelle de substances bioactives

Notre travail effectué sur la plante « ***Ranunculus repens L*** » réputée pour ses propriétés curatives en médecine traditionnelle, consiste à tester l'activité anti-microbienne de l'extrait de cette plante vis-à-vis de différents germes isolés de différents prélèvements pathologiques.

Une évaluation de cette activité antibactérienne et antifongique est réalisée par des tests de dilution et des tests de diffusion.

Les résultats les plus significatifs montrent une sensibilité de l'espèce ***Staphylococcus epidermidis*** à l'extrait brut de la plante fraîche du ***Ranunculus repens L***.

mots clés

Antibiotique - Activité antibactérienne - activité antifongique - alcaloïde - Extrait de plante - flavonoïde - principe actif - ***Ranunculus repens L***.

Theme

EVALUATION OF THE ANTIBACTERIAL AND ANTIFONGIQUE ACTIVITY OF THE EXTRACT OF THE PLANT « *Ranancalas repens L* »

ABSTRACT

The vegetal world has always cause researches in matter of new natural and Pharmacologically active chemical molecules. Thousand of plants are some of the little Exploited sources. Indeed researchers have possibilities of new medicine discoveries To part of this real natural mine of bioactive substances Our work done on the plant *Ranunculus repens L* well-known for his curative properties in traditional medicine, Consist to test the anti-microbial activity of the extract of this plant opposite of Different isolated germs of different pathological taking. An assessment of this Antibacterial activity and antifongique is achieved by tests of dilution and tests of diffusion.

The most meaningful results show a sensitivity of the species :

Staphylococcus epidermidis to the raw extract of the fresh plant of the *Ranunculus repens L.*

KEY WORDS : Antibiotic - antibacterial Activity - antifungic activity - alkaloid - Extract of plant - flavonoïde - active principle - *Ranunculus repens L*.

الموضوع

تقييم النشاط ضد بكتيري و ضد فطري لمستخلص نباتي ***Ranunculus repens L***

الملخص

إن العالم النباتي كان دائما محور بحوث من أجل إيجاد جزيئات كيميائية طبيعية جديدة ذات نشاط حيوي ضد العوامل الممرضة، حيث أن الآلاف من هذه النباتات بقيت قليلة الإستغلال.

إن للباحثين إمكانيات لإكتشاف أدوية جديدة إنطلاقا من هذا المنجم الطبيعي الغني بمواد ذات نشاط حيوي.

العمل الذي قمنا به يتمثل في إختبار النشاط ضد الميكروبي لمستخلص النبتة *Ranunculus repens L* المعروفة بخصائصها العلاجية و المستعملة في الطب الشعبي اتجاه مختلف الميكروبات المعزولة من مختلف العينات الفيزيولوجية للمرضى.

و لتقييم النشاط ضد البكتيري و ضد الفطري أستعملنا إختبارين :

إختبار التخفيف و إختبار الإنتشار، النتائج التي تؤخذ بعين الإعتبار هي نتائج التي تبين حساسية النوع *Staphylococcus epidermidis* تجاه المستخلص الخام للنبتة الخضراء *Ranunculus repens L*.

كلمات المفاتيح : مضاد حيوي – نشاط ضد بكتيري – نشاط ضد فطري – الألكالويدات – فلافونويدات – مادة فعالة – *Ranunculus repens L*