

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
Université de Jijel
Faculté des sciences
Département de biochimie et microbiologie

جامعة محمد الصديق بن يحيى
كلية علوم الطبيعة والحياة
المادة تربية :
رقم الجرد : 627



Mémoire

*De fin d'études en vue de l'obtention du diplôme
des études supérieures en biologie*

Option : Microbiologie

Thème

*Etude de l'activité antibactérienne
des alcaloïdes extraits
de la plante Hyoscyamus albus*

☞ Membres de jury :

Président : M^r Idoui Tayeb

Examinatrice : M^{me} Roula Sadjia

Encadreur : M^r Boudjerda Djamel

☞ Présenté par :

M^{lle} : Bouchekhou Lamia

M^{lle} : Hafsi Leila

M^{lle} : Bousha Fatima



Promotion: 2004 - 2005

Remerciement :

Nous remercions le bon dieu tout puissant qui nous a aidé à réussir nos études et nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à notre promoteur :

M^r Boudjerda Djamel : qui n'a jamais cessé de nous témoigner et de nous prodige ses précieux conseils.

Nos remerciement vont également à :

M^{me} Kebieche Zohra:pour ces aides.

M^r Idoui Tayed : enseignant à l'université de Jijel.

Tous les techniciens du laboratoire de microbiologie de l'université de Jijel.

M^{elle} Zennir Sonia., Hanane, Rachid, Moussa, pour les services qu'ils nous ont offert le long de nos études.

Nos vifs remerciements vont aux membres de jury, pour avoir accepté de juger ce modeste travail.

En fin nous exprimons notre reconnaissance pour tous ceux qui nous ont aidé et encouragé de près ou de loin.

Lamia Fatima, Leila

Sommaire

	Page
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	
Introduction.....	1
CHAPITRE I : Les plantes médicinales	
I-1. Définition.....	2
I-2. L'effet thérapeutique des plantes médicinales.....	2
I-3. Méthodes d'utilisation des plantes médicinales.....	3
I-3-1. L'infusions.....	3
I-3-2. Decoctions.....	3
I-3-3. Teintures.....	3
I-3-4. Sirops.....	4
I-3-5. Suc.....	4
I-3-6. Lotions et compresses.....	4
I-3-7. Les macérations à froid.....	4
CHAPITRE II : Les alcaloïdes	
II-1. Historique.....	5
II-2. Définition.....	5
II-3. Classification des alcaloïdes et principaux constituants de bases.....	6
II-4. Extraction des alcaloïdes.....	9
II-4-1. Extraction par un solvant en milieu alcalin.....	9
II-4-2. Extraction en milieu acide.....	9
II-5. Les propriétés des alcaloïdes.....	10
II-5-1. Propriétés toxiques.....	10
II-5-2. Propriétés pharmacologiques.....	10
II-5-3. Autres propriétés.....	11
CHAPITRE III : les alcaloïdes de <i>Hyoscyamus albus</i>	
III-1. Généralités sur <i>H.albus</i>	12
III-2. Constituants d'alcaloïdes de <i>H.albus</i>	13
III-3. Biosynthèse des alcaloïdes de <i>H.albus</i>	13
III-4. Les propriétés des alcaloïdes de <i>H.albus</i>	15
III-5. L'emploi des alcaloïdes de <i>H.albus</i>	16
CHAPITRE IV : Etude des bactéries	
IV-A. Les entérobactéries.....	17
IV-A-1. Données générales sur <i>Salmonella</i> et <i>Escherichia</i>	18
IV-A-1-1. Généralités sur les Salmonelles.....	18
IV-A-1-1-1. Caractères morphologiques.....	18
IV-A-1-1-2. Caractères antigéniques.....	18
IV-A-1-1-3. Pathogénécité.....	18
IV-A-1-1-4. Epidémiologie.....	19
IV-A-1-2. Généralités sur les <i>Escherichia</i>	19
IV-A-1-2-1. Caractères morphologiques.....	19
IV-A-1-2-2. Caractères antigéniques.....	19
IV-A-1-2-3. Pathogénécité.....	20
IV-A-1-2-4. Epidémiologie.....	20
IV-B. Les <i>Micrococcaceae</i>	20

IV-B-1. Généralités sur les <i>Staphylococcus</i>	20
IV-B-1-1. Caractères morphologiques.....	20
IV-B-1-2. Caractères antigéniques.....	21
IV-B-1-3. Pathogénicité.....	21
IV-B-1-4. Epidémiologie.....	22
IV-C. <i>Streptococcaceae</i>	23
IV-C-1. Généralités sur <i>Streptococcus</i>	23
IV-C-1-1. Caractères morphologiques.....	23
IV-C-1-2. Caractères antigéniques.....	23
IV-C-1-3. Pathogénicité.....	24
IV-C-1-4. Epidémiologie.....	24

ETUDE EXPERIMENTALE

I. Matériel et méthodes.....	26
I-1. Matériel.....	26
I-1-1. Matériel bactériologique.....	26
I-1-2. Matériel végétal.....	26
I-1-3. Milieu de culture.....	26
I-1-4. Les réactifs.....	27
I-1-5. Autres matériels.....	27
I-1-6. Matériel d'extraction des alcaloïdes.....	28
I-2. Méthodes.....	28
I-2-1. Méthodes de l'étude bactériologique.....	28
I-2-1-1. Revivification des souches.....	28
I-2-1-2. Isolement des souches.....	28
I-2-1-3. Purification des souches.....	29
I-2-1-4. Identification des souches utilisées.....	29
I-2-1-4-1. Identification morphologique.....	29
I-2-1-4-2. Identification biochimique.....	30
I-2-1-4-2-1. Métabolisme glucidique.....	31
a- Attaque du mannitol.....	31
b- Fermentation des sucres milieu TSI.....	31
I-2-1-4-2-2. Caractérisation des divers types fermentaires.....	32
a- Réaction au rouge de méthyle (RM).....	32
b- Réaction de voges-Proskauer (VP).....	33
I-2-1-4-2-3. Etude de métabolisme d'acide organique.....	34
-Utilisation du citrate de Simmons.....	34
I-2-1-4-2-4. Métabolisme protéique.....	35
a- Recherche d'une uréase.....	35
b- Recherche d'indole.....	36
c- Dégradation des acides aminés.....	37
I-2-1-4-2-5. Recherche de nitrate réductase.....	39
I-2-1-4-2-6. Recherche d'une catalase.....	39
I-2-2. Méthodes d'extraction des alcaloïdes à partir de la plante <i>H. albus</i>	40
I-2-3. Méthode de test de sensibilité.....	43
I-2-3-1. Préparation du milieu de culture.....	43
I-2-3-2. Préparation de l'inoculum.....	43
I-2-3-3. Ensemencement par inondation.....	43
I-2-3-4. Confections des puits.....	43
I-2-3-5. Préparations des dilutions.....	43

II. Résultats et discussion

II-1. Etude bactériologique.....	45
II-2. Test de sensibilité.....	51
Discussion générale.....	59
Conclusion.....	60
Références bibliographiques.	
Annexe.	

LISTE DES TABLEAUX

	Page
Tableau 1: Classification des alcaloïdes.	7 et 8
Tableau 2: Principaux facteurs de virulence de <i>S.aureus</i> .	22
Tableau 3: Les différentes doses des phytohormones.	40
Tableau 4: Préparation des dilutions des alcaloïdes et celles des extraits bruts de <i>H.albus</i> dans éthanol dilué (30%).	44
Tableau 5: Les tests d'identifications des souches d' <i>Escherichia</i> .	46
Tableau 6: Les tests d'identifications des souches de <i>Salmonella</i> .	47
Tableau 7: Résultats de test de sensibilité des souches utilisées vis-à-vis des 9 extraits bruts de <i>H.albus</i> .	56
Tableau 8: Résultats de test de sensibilité des souches utilisées vis-à-vis des 9 extraits d'alcaloïdes de <i>H.albus</i> .	57
Tableau 9: Les diamètres des zones d'inhibitions (mm) des souches des <i>Streptococcus</i> vis-à-vis des extraits bruts 7 , 8 et 9.	58
Tableau 10: Les diamètres des zones d'inhibitions (mm) des souches des <i>Streptococcus</i> vis-à-vis des extraits d'alcaloïdes 7 , 8 et 9.	58

LISTE DE ABREVIATIONS

ADH: Arginine dihydrolase.

BN:Bouillon nutritif.

°C:Degré sessus.

CMI:Concentration minimale inhibitrice.

Fig : Figure

Glu : Glucose.

h :Heure.

H. albus : *Hyoscyamus albus*

Lac : Lactose.

LDC : Lysine décarboxylase.

LPS : Lipopolysaccharide.

Man : Mannose.

min : minute.

Mob : Mobilité.

N : Normalité.

pH : Potentiel hydrogène.

ODC : Ornithine décarboxylase.

RAA : Rhumatisme articulaire aigue.

RM : Rouge de méthyle.

T °: Température.

VP : Vogue Proskauer.



Introduction

Introduction :

La plupart des espèces végétales qui poussent dans le monde entier possèdent des vertus thérapeutiques, car elles contiennent des principes actifs qui agissent directement sur l'organisme, elles nous offrent un médicament naturel qui permet des traitements plus globaux et moins agressifs, elles désinfectent aussi la nourriture et préservent la santé [40].

De la préhistoire jusqu'à nos jours, les alcaloïdes ou des extraits qui en renferment ont été utilisés comme médicaments relaxants musculaires, analgésiques, tranquillisants et psychotropes [20].

C'est dans ce cadre que s'inscrit notre travail et qui se divise en deux parties :

- ❖ Une partie bibliographique qui porte sur l'étude théorique des plantes médicinales, des alcaloïdes y compris ceux de *Hyoscyamus albus*, ainsi qu'une étude microbiologique des entérobactéries (*Salmonella*, *E.coli*), des *Micrococcaceae* (*Staphylococcus aureus*) et des *Streptococcaceae* (*Streptococcus*).

Une partie expérimentale qui a pour but de purifier et d'identifier 5 souches de *Salmonella*, 5 souches d'*Escherichia*, 5 souches de *Staphylococcus* et 5 souches de *Streptococcus*, et de tester la sensibilité de ces dernières vis-à-vis des 9 extraits des alcaloïdes de *Hyoscyamus albus*.

Partie ①

Synthèse bibliographique

I-1. Définition :

Une plante est dite médicinale lorsque « au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses » [9].

Aujourd'hui une nombreuse population dans les pays en voie de développement pratiquent la médecine par les plantes. En Europe et en Amérique du nord, on assiste à un renouveau de l'intérêt envers ces techniques naturelles, grâce à une meilleure connaissance des mécanismes qui régissent l'action des plantes mais aussi à la création de standards de sécurité, de qualité et de fiabilité en matière de préparation [42].

Les plantes contiennent des éléments actifs qui les aident à se défendre des prédateurs, mais aussi de l'excès de rayons ultra violet [15]. Il suffit de les connaître, de les étudier pour savoir que leur bois, leurs feuilles, leurs racines et leurs fleurs, s'exhalent de vivifiantes essences qui fortifient nos organes régénérant notre sang et neutralisent les principes méphitiques qui nous entourent [29].

I-2. L'effet thérapeutique des plantes médicinales :

Plusieurs milliers des plantes sont utilisées de par le monde, leur champ d'action est vaste et leur puissance varie. La plupart ont des effets spécifiques sur certaines parties de l'organisme [40] :

- les antiseptiques, tel que melaleuca, désinfectent la peau.
- les immunostimulants, comme l'échinacée, aident le système nerveux à prévenir les infections.
- les plantes émollients : calment les démangeaisons.
- des plantes ont des propriétés antibiotiques, tel que l'ail, améliorent la capacité de résistante des poumons.
- les plantes à propriété hormonale : certains espèces sont utiles pour soulager les règles douloureuses.
- les diurétiques, comme le mais, stimulent la production d'urine.
- les plantes analgésiques, tel que jasmin sauvage, soulagent la douleur aux articulations.
- les plantes à propriété antispasmodique, tel que le quinquina, relâchent la tension musculaire.

- les sédatifs : sont utilisés pour modérer l'activité nerveuse.
- les plantes à propriété cardiotonique, comme le souga, ont des actions variables. Certains ralentissent le rythme du cœur, alors que d'autre l'accélèrent.
- les cholérétiques, tel que l'artichaut, stimulent la sécrétion de la bile.

Comme il peut trouver des plantes à propriétés toniques, astringentes, hépatiques [29].

I-3. Méthodes d'utilisation des plantes médicinales :

Les plantes médicinales faisaient l'objet d'une variété de préparation telles qu'infusions, décoctions et teintures [10].

La plupart de ces préparations ne présentent aucune difficulté mais elles sont parfois longues à réaliser [40].

I-3-1. L'infusion :

L'infusion est la façon la plus simple d'accommoder les feuilles et les fleurs pour obtenir des remèdes ou des boissons fortifiantes ou calmantes, on la prépare exactement comme le thé, à partir d'une seule plante ou d'un mélange de plusieurs et on la boit chaude ou froide [29].

I-3-2. Décoctions :

Pour extraire les principes actifs de racines, de l'écorce, des tiges et des baies, il faut généralement leur faire subir un traitement plus énergique qu'aux feuilles ou aux fleurs, une décoction consiste à faire bouillir dans de l'eau les plantes séchées ou fraîches, préalablement coupées en petits morceaux, on peut la consommer chaude ou froide [29].

I-3-3. Teintures :

Pour obtenir une teinture, il suffit de laisser macérer une plante dans de l'alcool, les substances actives se dissolvent ainsi facilement. Les teintures sont plus efficaces que les infusions ou les décoction, d'une emploi simple, elles se conservent pendant deux ans [40].

I-3-4. Sirops :

Le miel et le sucre non raffiné sont des conservateurs efficaces qui peuvent être mélangés à des infusions et des décoctions pour donner des sirops et des cordiaux, ils ont en outre des propriétés adoucissantes qui font d'excellents remèdes pour soulager les maux de gorge. La saveur sucrée des sirops permet de masquer le mauvais goût de certaines plantes de manière à ce que les enfants les absorbent plus volontiers [10].

I-3-5. Suc :

C'est un liquide qu'on obtient par simple écoulement de la sève à l'extérieur d'un tronc, ou lorsqu'on presse les fruits, les feuilles ou la tige [10].

I-3-6. Lotions et compresses :

Les lotions sont des préparations à base d'eau et de plantes, infusions décoctions ou teintures diluées, dont on tamponne l'épiderme aux endroits irrités ou enflammés, les compresses sont des linges imbibés de lotion que l'on applique sur la peau, lotions et compresses contribuent à soulager les gonflements, les contusions et les douleurs, à calmer inflammations et maux de tête, et à faire tomber la fièvre [29].

I-3-7. Les macérations à froid :

La chaleur détruit les principes actifs de certaines plantes, c'est pour ça on fait une macération à froid [40].

Chapitre II

Les alcaloïdes

II-1. Historique :

Si la notion d'alcaloïde est assez récente, la connaissance de la toxicité et des propriétés des plantes et des drogues à alcaloïdes est très ancienne. C'est vraisemblablement **derosne** qui en 1803 extrayant un mélange de narcotine et morphine de l'opium, en 1806 **serturner** découvre la morphine, une dizaine d'années plus tard la caféine, émétine, strychnine [9].

L'isolement, au début des années cinquante, de la réserpine et le succès thérapeutique de celle-ci ont incité les phytochimistes à explorer systématiquement ce vaste domaine des alcaloïdes, le nombre des structures décrites ne cesse de progresser et les données structurales, biosynthétique, synthétique ou pharmacologiques sont maintenant tout à fait considérables [9].

II-2. Définition :

Le mot « **alcaloïde** » est synonyme du mot « **drogue** » [20].

Les alcaloïdes forment une grande famille très hétérogène de métabolismes secondaire qui présentent un intérêt de par leurs propriétés pharmacologique et leur application en médecine [40], leurs caractéristiques communes sont :

- ❖ leur solubilité dans l'eau.
- ❖ la présence d'au moins un atome d'azote qui accepte souvent un proton, ce qui leur confère un caractère légèrement basique en solution.

Dans leur majorité les alcaloïdes sont hétérocycliques, bien que quelques composés azotés aliphatiques (non cycliques) comme la mexaline et la colchicine soient parfois classés dans les alcaloïdes [20].

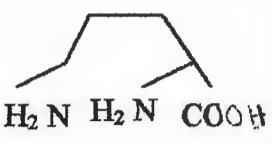


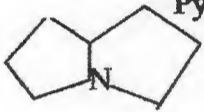
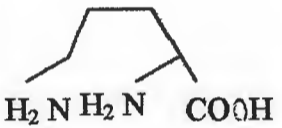
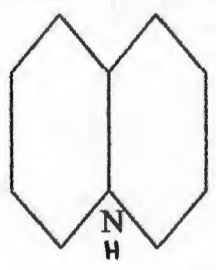
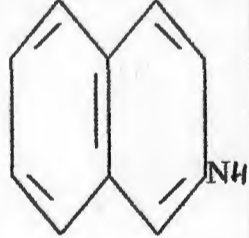
On les rencontre dans de nombreux groupes de plantes, mais ils sont caractéristiques de certaines familles tels les *solanacées* [9].

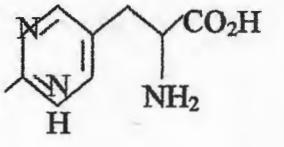
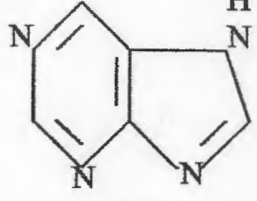
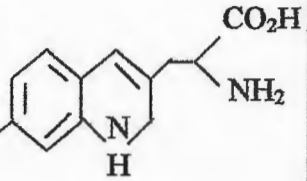
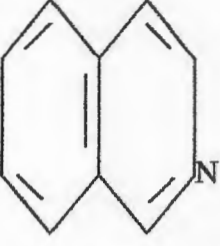
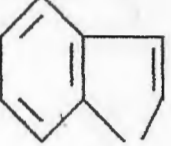
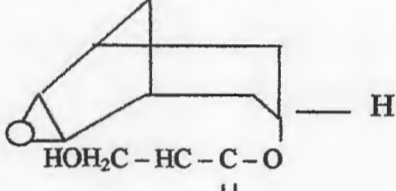
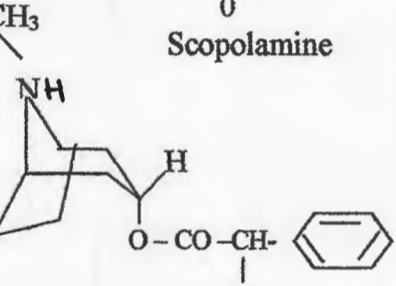
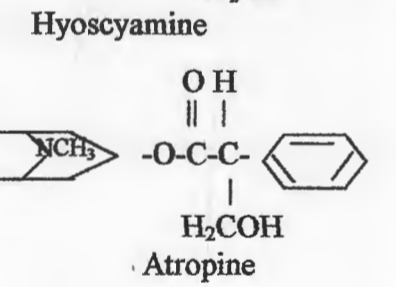
II-3. Classification des alcaloïdes et principaux constituants de bases :

Les alcaloïdes sont généralement classés en fonction de la nature de cycle qui prédomine dans la molécule, cependant malgré leur structure extrêmement variée, les alcaloïdes proviennent d'un petit nombre de précurseurs simples. La plupart des alcaloïdes sont synthétisés à partir d'une structure moléculaire d'acides aminés comme : tyrosine, tryptophane, ornithine ou arginine et lysine [5].

Les principaux constituants de bases des alcaloïdes sont représentés dans le tableau N° :1

Tableau N° 1 : Classification des alcaloïdes. [15] [9]

Acide de départ	Classe d'alcaloïde	Exemple
 <p>Ornithine</p>	 <p>NH₂</p>	Nicotine
	 <p>tropane</p>	Atropine
	 <p>Pyrolizidine</p>	sénécionine
 <p>Lysine</p>	 <p>quinolizidine</p>	lupinine
	 <p>isoquinoleine</p>	papavérine

 <p>Histidine</p>	 <p>Purine</p>	<p>Caféine</p>
 <p>tryptophane</p>	 <p>Quinoléine</p>	<p>Quinine</p>
	 <p>Indole</p>	<p>Vindoline</p>
<p>Pour <i>H. albus</i></p> <p>Ornithine</p>	<p>Tropane</p>	 <p>Scopolamine</p>  <p>Hyoscyamine</p>  <p>Atropine</p>

II-4. Extraction des alcaloïdes :

L'extraction des alcaloïdes est fondée sur la solubilité différentielle des bases et des sels dans l'eau d'une part, dans les solvants organiques d'autre part [9].

II-4-1. Extraction par un solvant en milieu alcalin :

La méthode d'extraction en milieu alcalin se fait selon les étapes suivantes :

1^{er} étape : la drogue pulvérisée et délipidée est mélangée à une solution aqueuse alcalin qui déplace les alcaloïdes de leurs combinaisons salines, les bases ainsi libérées sont ensuite solubilisées dans un solvant organique.

2^{ème} étape : le solvant organique contenant les alcaloïdes bases est séparé du marc, si nécessaire, concentré partiellement par distillation sous pression réduite, puis agité avec une solution aqueuse acide où les alcaloïdes se solubilisent dans cet phase sous forme de sels.

3^{ème} étape : les solutions aqueuses de sels d'alcaloïdes sont épuisées par un solvant organique non miscible à l'eau jusqu'à ce que tous les alcaloïdes soient repassés en phase organiques.

En dernier lieu le solvant organique contenant les alcaloïdes est évaporé sous pression réduite, il reste alors un résidu sec : les alcaloïdes totaux [9].

II-4-2. Extraction en milieu acide :

Deux cas peuvent se représenter :

- ❖ dans le premier cas la drogue pulvérisée est directement épuisée par de l'eau acidifiée.
- ❖ dans le second, l'épuisement de la drogue pulvérisée est avec une solution alcoolique ou hydroalcoolique acidifiée.

L'extraction est suivie d'une distillation sous vide qui élimine l'alcool et laisse une solution aqueuse acide de sels d'alcaloïdes qui doit purifier par l'une des techniques suivantes :

- 1-la même technique précédente.
- 2-les alcaloïdes contenus dans la solution sont fixés sur une résine échangeuse d'ion, puis les élues à l'aide d'un acide fort.

3-les alcaloïdes sont précipités sous forme d'iodomercures. Le complexe formé est récupéré par filtration, solubilisé dans un mélange hydro alcool acétonique et décomposé par passage sur une résine échangeuse d'ion [9].

II-5. Propriétés des alcaloïdes :

II-5-1. Propriétés toxiques :

A forte dose la plupart des alcaloïdes sont très toxiques. Des doses de 60-90mg de strychnine provoquent des crampes musculaires, dont une paralysie de la respiration entraînant la mort [21]. Ainsi une trop forte dose de réserpine entraîne une chute de tension, des extrasystoles et une insuffisance cardiaque aigue, une diarrhée, un traitement prolongé par des doses massives déclenche des psychoses [9]. L'émétine, extrait de l'épitarpe, peut provoquer une myocardite aigue, une atteinte rénale et surtout une polynévrite. On retient ainsi que certains alcaloïdes sont fréquemment responsables des empoisonnements du bétail tel la lupinine [9].

II-5-2- Propriétés pharmacologiques :

Les alcaloïdes sont des substances particulièrement intéressantes pour leurs activités pharmacologiques qui s'exercent dans les domaines les plus variés [40] :

- ❖ au niveau du système nerveux central, qu'ils soient dépressifs (morphine, scopolamine) ou stimulants (strychnine, caféine) [34].
- ❖ au niveau du système nerveux autonome : sympathomimétique (éphédrine) ou sympatholytique (yohimbine, certains alcaloïdes de l'ergot de seigle) anticholinergiques (atropine, hyoscyamine) ganglioplégiques (spartine, nicotine) [34].

On montra aussi l'existence d'anesthésique locale (cocaïne), d'antifibrillants (quinidine) d'antitumoraux (vinblastine, ellipticine) d'antipaludiques (quinine), antifongique [21].

II-5-3- Autres propriétés :

Du fait de leur goût amer, les alcaloïdes peuvent protéger les plantes de la consommation par les animaux (herbivores) [10], comme ils paraissent servir de moyen de dissuasion contre les insectes telle la nicotine qui a été l'un des premiers insecticides utilisés par l'homme [31] [9].

Chapitre III

Les alcaloïdes de H. albus

III-1. Généralités sur *H. albus* :**III.1.1 Définition :**

Hyoscyamus albus est une plante herbacée annuelle ou bisannuelle de 40 à 50 cm de hauteur. On peut le trouver plus principalement en Méditerranée et en Asie mineur [34]. La tige, velue et visqueuse droite, mais paraît souvent buissonneuse, porte des feuilles ovales orbiculaires, molles pétiolées à la base, dentées. Les calices ainsi que les fruits fortement velus. Les fleurs jaune clair sont souvent violet foncé à l'intérieur. Les graines sont blanches ocre ou plus rarement grises [31]. Cette plante possède une odeur désagréable et une saveur assez amère, la teneur d'alcaloïdes varie de 0,7 à 1,5% du poids sec et se trouve notamment au niveau des fleurs et des feuilles [31]. (Voire fig. :1).



FigureN° 01 : La plante de *Hyoscyamus albus*.

III-1.2. Classification :

Les données taxonomiques de la plante sont les suivantes [45] [4] :

Règne : végétale.

Embranchement : phanérogames.

Sous embranchement : angiospermes.

Classe : dicotyledones.

Ordre : tubiflorales.

Famille : *Solanaceae*.

Genre : *Hyoscyamus*.

Espèce : *Hyoscyamus albus*.

III-2. Constituants d'alcaloïdes de *H. albus*:

Les alcaloïdes produits par la plante *H. albus* sont appartenus au groupe des alcaloïdes dérivés du tropane qui présente des esters de certains acides organiques, dont les principaux alcaloïdes sont : Hyoscyamine , Atropine et Scopolamine[44]..(voire tableau 1).

III-3. Biosynthèse des alcaloïdes de *H. albus* :

Le point de départ de la voie de synthèse des alcaloïdes dérivés du tropane c'est l'ornithine [31]. Ce dernier après une phase de méthylation et décarboxylation donne un composé appelé N-méthyl-1,4 diaminobutane, qui se transforme en N-méthyl 4 diamino butane puis en composé cyclique la N-méthylpyr'alinium qui associé avec l'acéto acétyle CoA en donnant l'Hygrine, la deshydrohygrine...jusqu'à la formation de la tropine . L'estérification de la tropine par l'acide tropique conduit a la Hyoscyamine qui transforme en présence d'oxygène en Scopolamine [31] (fig. : 2).

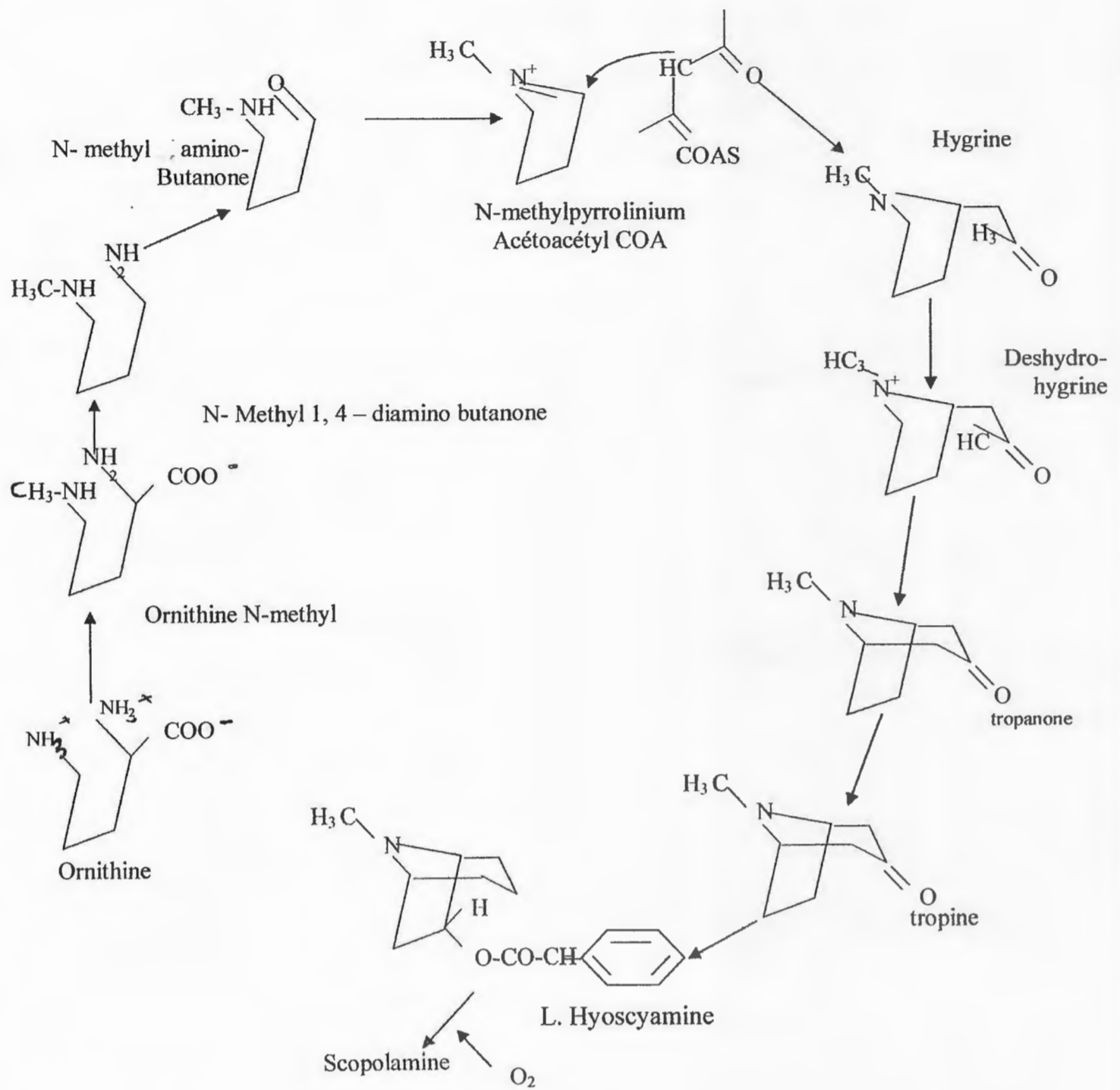


Fig.N° 02 : Voie de biosynthèse des alcaloïdes dérivés du tropane chez *H. albus* > 1
 [Richter 1993, Guinord 1996]

III-4. Les propriétés des alcaloïdes de *H. albus* :

Les propriétés des alcaloïdes de *H. albus* soient mal précisées, mais on peut noter quelques effets sur l'organisme.

Atropine :

Atropine et *hyoscyamine* ont la même activité ; ce sont des parasympatholytiques, l'*hyoscyamine* est plus active que l'atropine mais c'est cette dernière qui est habituellement préparé et utilisé, l'atropine inhibe de façon compétitive et réversible la fixation de l'acétylcholine sur ses récepteurs en provoquant au niveau des organes concernés des effets d'apparence sympathomimétique [9] :

- ❖ au niveau cardiaque, l'atropine élève le rythme par suppression de l'action frénatrice du vague.
- ❖ au niveau des fibres lisses l'atropine induit un relâchement des fibres, paralysie des uretères, augmentation de la pression intra-vésicale.
- ❖ au niveau de l'ensemble des sécrétions, les sécrétions salivaires, gastriques sont freinées.
- ❖ au niveau oculaire, l'alcaloïde induit une mydriase passive, par paralysie des muscles constricteur iriens [9].

Scopolamine :

L'activité parasympatholytique de cet alcaloïde est identique à celle de l'atropine mais beaucoup moins marquée, surtout au niveau myocardique [29].

A côté de ses effets sur le système nerveux autonome, l'atropine exerce des effets consécutifs à son interaction avec les récepteurs muscariniques centraux : agitation, exagération des relaxes aux fortes doses, mais à faible dose l'action est à tendance dépressive, sédative [9].

III-5. L'emploi des alcaloïdes de *H.albus* :

La plupart des alcaloïdes y compris ceux de *H.albus* ont un goût amer, si bien qu'on leur attribue généralement un effet de répulsion vis-à-vis de tous les animaux y compris les insectes [20].

A forte dose la plupart des alcaloïdes sont très toxiques, par contre à faible dose ils peuvent avoir une valeur thérapeutique [21]. Les alcaloïdes synthétisés par *H.albus* peuvent jouer divers rôles en médecine :

- ❖ **Atropine** a été utilisé en pré-anesthésie, en ophtalmologie et dans le traitement symptomatique des diarrhées, des manifestations spasmodiques et douloureuses aiguës [9].
- ❖ **Hyoscyamine** est beaucoup moins utilisé que l'atropine [9].
- ❖ **Scopolamine** a été utilisé dans le traitement de la maladie de parkinson et dans celui de la manifestation spasmodique douloureuse [40]. Il peut être utilisé en pré -anesthésie. L'utilisation principale actuelle de la scopolamine est la prévention des symptômes du mal des transports [9].

Chapitre IV

Etude des bactéries

IV-4. Les Entérobactéries :

La famille des *Enterobacteriaceae* est la plus grande famille de la section 5 du Bergcy's manuel [22].

Elle contient des bacilles droits, GRAM négatif ayant en commun des caractères suivants :

- ❖ ce sont des bacilles à GRAM négatif.
- ❖ cultivent bien sur milieux ordinaires à pH neutre et à température 37 °C
- ❖ cultivent en aérobie et en anaérobie.
- ❖ utilisent le glucose par métabolisme fermentatif avec ou sans production de gaz.
- ❖ réduisent les nitrates en nitrites.
- ❖ mobiles par une ciliature péritriche ou immobiles.
- ❖ ont une réaction oxydase négative, catalase positive (sauf *Shigella dysenteriae*) [17] [38] [26].

La famille des *Enterobacteriaceae* se subdivise en cinq tribus : *Escherichiae*, *Klebsiellae*, *Proteae*, *Yersineae*, *Erwiniae* [39].

Les différents types d'antigènes dans une entérobactérie sont représentés dans la figure N°: 3 [13].

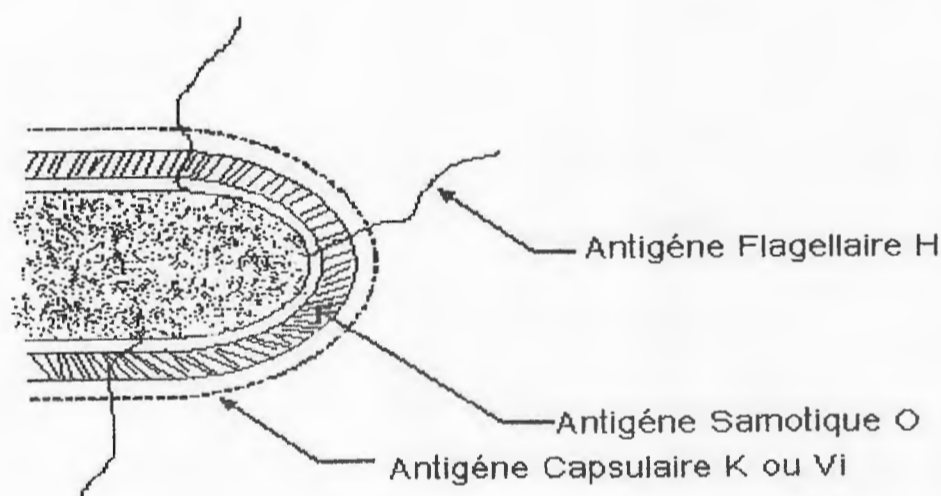


Fig.N°3 Localisation des antigènes H,O et K dans une entérobactérie [13].

IV-1-1. Données générales sur *Salmonella* et *Escherichia*:**IV-1-1-1. Généralités sur les salmonelles :****IV-1-1-1-1. Caractères morphologiques :**

Les salmonelles ont été découvertes en 1880 par EBERTH [8]. Ce sont des bacilles à GRAM négatif de 0,7 à 1,7 μm de large et 2,0 à 5,0 μm de long très mobiles grâce à une ciliature péritriche, mais de mutants immobiles peuvent exister, et *Salmonella gallinarum* est toujours immobile, cultivent facilement sur milieu ordinaire à pH neutre et à température 37 °C [7] [35].

IV-1-1-1-2. Caractères antigéniques :

Les salmonelles possèdent trois types d'antigènes présentant un intérêt diagnostique [37] :

-**Les antigènes d'enveloppe (K) :** Ce sont des polysaccharides capsulaires, ils masquent l'agglutination O, ces antigènes n'ont été identifiés que chez 3 sérovars : *S. typhi*, *S. paratyphi C* et *S. Dublin*[7].

-**Les antigènes de paroi ou antigènes somatiques ou antigènes O :** Les antigènes O sont portés par les chaînes spécifiques du lipopolysaccharide (LPS), qui est le composant majoritaire de membrane externe de la paroi bactérienne. Ces antigènes O sont résistants à la chaleur et à l'alcool mais sont détruits par le formol[37].

-**Les antigènes flagellaires ou antigènes H :** Les antigènes H sont des polymères de flagelline qui est la protéine de structure de flagelles. La composition en acides aminés et les autres niveaux de structure déterminent la spécificité antigéniques de ces antigènes H. ces antigènes sont thermolabiles mais résistants au formol[7].

IV-1-1-1-3. Pathogénicité:

Les salmonelloses font parties des bactéries enteropathogènes invasives à multiplication intracellulaire, après adhésion à la muqueuse intestinale et destruction de la bordure en brosse des anthérocytes, les bactéries pénètrent dans la cellule par invagination de la membrane en causant des lésions ulcératives [39].

Selon la conception de REILLY : après avoir passé la barrière intestinale, les bactéries arrivent au niveau des ganglions mésentériques ; ils s'y multiplient abondamment, une partie de la population bactérienne passe par voie lymphatique dans le courant sanguin .ce qui explique la septicémie [39].

IV-A-1-1-4. Épidémiologie :

Les salmonelles sont répandues dans le monde entier, mais de façon plus importante, en Amérique du nord et en Europe, incidence plus élevée chez les nourrissons et les jeunes enfants, petites épidémies dans la population générale et même en Afrique [37].

IV-A-1-2. Généralités sur les *Escherichia* :

IV-A-1-2. Caractères morphologiques :

E. coli a été isolée pour la première fois par THEODOR VON ESCHERICHÉ en 1885 [3]. Ce sont des bacilles à extrémités arrondies et appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae*. Elles mesurent au plus 2 à 3µm de long pour 0.5µm de large, mobiles par flagelles péritriches [1].

Cultive facilement sur milieu ordinaire à pH neutre [3].

IV-A-1-2-2. Caractères antigéniques :

Escherichia coli présente à leur surface de nombreuse structure antigénique. Trois variétés d'antigènes sont importantes pour l'identification et la classification des souches [37]:

-Les **antigènes O** ou **antigènes somatiques** : De nature lipopolysaccharidiques. Il existe environ 160 antigènes O différents. Au moyen d'immun- sérums spécifiques, il est possible de classer sérologiquement les souches de *E. coli* dans les groupes O [3].

-Les **antigènes K** ou **antigènes capsulaires** : De nature polysaccharidiques, environ 70 antigènes d'enveloppe différents ont été reconnus, la majorité des souches responsables de méningites possèdent l'antigènes K [3].

-Les antigènes H ou antigènes flagellaires : De nature protéiques, on en connaît 52 types. Ils ne sont présents que chez les souches mobiles [37].

IV-A-1-2-3. Pathogénicité :

E.coli ou colibacille est habituellement une bactérie commensale. Elle peut devenir pathogène si les défenses d'hôte se trouvent affaiblies ou si elle acquiert des facteurs de virulence particuliers [28].

- ❖ l'adhésion des bactéries aux cellules intestinales.
- ❖ la production de grandes quantités de vérotoxines.
- ❖ la production d'une hémolysine et la capacité à utiliser le Fer [37].

IV-A-1-2-4. Épidémiologie :

Les affections dues au *E.coli* sont essentiellement d'origine alimentaire. Elles se manifestent du point de vue épidémiologique comme des anadémies en collectivité fermée ou ouverte dont certaines ont été très marquantes par le nombre élevé de malades (1996, 5700. Cas au Japon) [37].

IV-2^a. Les micrococcaceae :

Les micrococcaceae sont des cocci GRAM positif, immobiles d'un diamètre 0,5 à 2,5 μm qui se divisent plus d'un plan pour former des amas de cellules réguliers ou irréguliers, tous sont aérobies anaérobies facultatif. Ces cocci sont des contaminants fréquents dans l'industrie alimentaire et parfois des agents redoutés [22] [16]. Les deux genres les plus importants sont : *Micrococcus* et *Staphylococcus* [16].

V-2-1. Généralités sur les *Staphylococcus*:

V-2-1-1. Caractères morphologie :

Les staphylocoques ont été découverts dans un pus par Pasteur en 1880, il s'agit de cocci GRAM positif de diamètre 0,9 à 1,3 μm , isolés ou en amas irréguliers, non mobiles et non sporulant [23].

Leur culture est facile sur les milieux ordinaires [11].

V-B-1-2. Caractères antigéniques :

Plusieurs substances de la paroi des staphylocoques jouent un rôle dans les réactions immunologiques [6] :

-**Le peptidoglycane** : Les staphylocoques possèdent des peptidoglycane, leur structure est bien connue, le diaminoacide présent est la L.lysine [3].

-**Les acides teichoïques** : Les acides teichoïques liés de façon covalente aux chaînes de peptidoglycane. Ils jouent un grand rôle sur les interactions entre bactéries et cellules et sur fixation des bactériophages, de plus ils sont antigéniques [37].

-**Polysaccharides de surface** : Ces antigènes de surface ont été décrits chez des souches capsulées, certains de ces polysides empêchent l'activation de la voie alterne du complément et protègent ainsi la bactérie de la phagocytose et de l'action bactéricide du sérum [37].

-**La protéine A** : Capable de réagir non spécifiquement avec les immunoglobulines G, en se fixant sur leur fraction FC, elle précipite donc avec tous les sérums humains normaux. Elle sensibilise les hématies tannées de mouton utilisées dans la réaction d'agglutination [13].

-**Les antigènes de type et sérotypie** : Certaines souches possèdent des facteurs antigéniques de surface utilisés dans des classifications. Il existe près de 30 facteurs antigéniques [13].

-**La lysotypie** : de très nombreux bactériophages staphylococciques ont été isolés, une vingtaine ont été reconnus comme étant assez spécifiques pour permettre de classer la plupart des souches dans l'un des quatre groupes bactériophagique principaux I-II-III-IV [3].

IV-B-1-3. Pathogénicité :

Les Staphylocoques sont des germes potentiellement pathogènes, en particulier *Staphylococcus aureus*, ils sont responsables de nombreuses infections groupées sous le nom de Staphylococcies dont les manifestations cliniques en dehors des septicémies, sont très divers à localisation multiple [13].

La virulence des souches de staphylocoque impliqué dans ces infections est liée à la production d'une grande variété de composés. Ces composés sont soit associés à la

paroi de la bactérie (protéine A, récepteurs pour des glycoprotéines de l'hôte, polysides capsulaires), soit excrétés dans l'environnement de la bactérie (toxine, coagulase, enzymes.) [37].

Les facteurs de virulence majeurs de *S aureus* sont présents dans tableau 2.

Tableau N° 2 : principaux facteurs de virulence [37].

Composés	Rôle démontré ou présumé dans la virulence
Composés associés à la paroi Protéine A Polysides capsulaires Adhésines	Résistance à la phagocytose (?) Résistance à la phagocytose Adhésion aux cellules de l'hôte Colonisation
Toxiques protéiques Toxines Entérotoxines (A, B, C, D, E et H) Exfoliatine Toxine du syndrome du choc toxique (TSST-1)	Lésions cellulaires et tissulaires .lyse des hématies (?) Action émétique. Etat de choc modéré Décollement des couches superficielles de l'épiderme (maladie de Ritter du nouveau-né) Etat de choc (dérèglements physiologiques multiples)
Coagulase et enzymes Coagulase Hyaluronidase, Lipase, phosphatase, Nucléase, protéases	Formation de thrombus Diffusion tissulaire de <i>S.aureus</i> Dégradations cellulaires ou tissulaires. Fourniture de nutriments à <i>S.aureus</i>

IV-B-1-4. Épidémiologie :

Les Staphylococcies sont répandus dans le monde entier, mais survient particulièrement dans les endroits où l'hygiène personnelle laisse à désirer, existe dans les hôpitaux où se développent des souches résistantes à l'antibiotique [39].

IV-C. Streptococcaceae :

La famille des *Streptococcaceae* regroupe des genres très fréquentes dans l'industrie alimentaire comme contaminants et surtout comme agents de fermentation lactique .Il s'agit des cocci GRAM positif asporulés, immobiles, aérobies anaérobies facultatifs, généralement groupés en paires et surtout en chaînes de longueur variable [24].

Les principaux genres sont : *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus* [23].

IV-C-1. Généralités sur streptococcus**IV-C-1-1. Caractères morphologiques**

Cette forme est observée pour la première fois dans les lésions d'érysipèle en 1874 par le chirurgien Viennois Christian Bibothe [3].

Ce sont des cellules ovoïdes, sphériques de 0,5 à 1 µ m de diamètre ou quelque fois allongées en fuseaux, asporulé à GRAM positif, immobiles sauf exception , elles se divisent sur un seul plan pour former des paires ou des chaînettes [39] [26].

Les streptocoques ont des exigences nutritives très complexes [39].

IV-C-1-2. Caractères antigéniques :

Les streptocoques peuvent posséder des antigènes présentant un intérêt diagnostique :

-**Les antigènes de la paroi** : l'antigène le plus profond est le mucopeptide ou peptidoglycane [28].

-**La structure la plus superficielle parfois présente chez le streptocoques**: est une capsule d'acide hyaluronique dépourvue de propriété antigéniques .elle favorise la virulence. En empêchant la phagocytose par les macrophages et les polynucléaires : les antigènes de structure les plus importants sont le polysaccharides C et les protéines M, R et T (voire Figure N° : 4) [37].

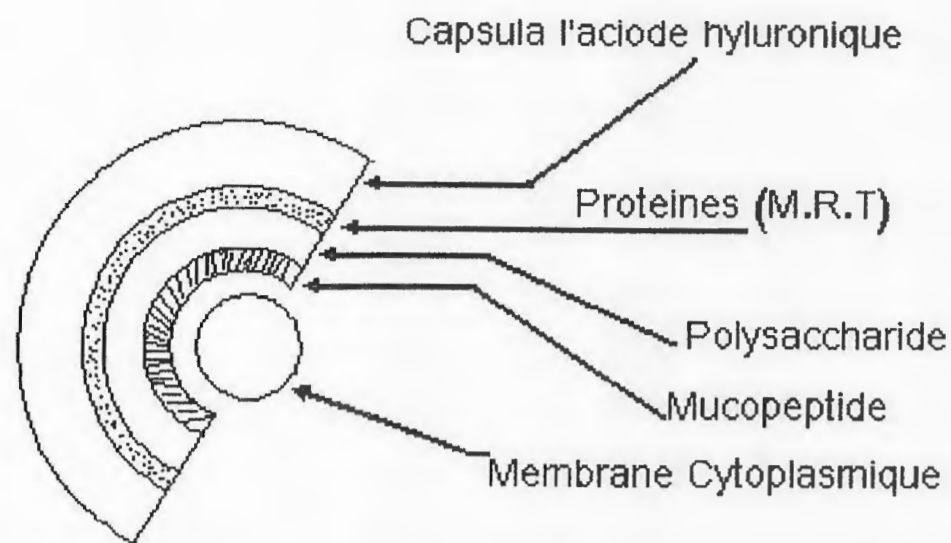


Fig.N°4 Structure de la paroi Streptocoque A. (d'après Krause) [13].

IV-C-1-3. Pathogénicité :

Les Streptocoques sont responsables de nombreuses infections dont la nature et la gravité sont variables selon les espèces et les groupes antigéniques [12]. *S.pyogens* est la seule espèce considérée comme « pathogène » parmi les autres streptocoques [1].

La protéine M est le facteur majeur de sa virulence. Elle détermine l'invasion par adhérence de ses fimbries aux surfaces des cellules épithéliales des muqueuses ou de la peau [39], en causant l'érysipèle, l'impétigo, pyodermites [26].

De plus, la protéine M possède une action antiphagocytaire à laquelle l'acide hyaluronique de la capsule est associée [24].

À côté de ces infections *S.pyogens* peut être aussi à l'origine des complications non suppuratives : Rhumatisme articulaire aigu (RAA), glomérulonéphrite aiguë [1].

D'autres espèces du genre *streptococcus* sont aussi responsables d'infections de gravité variable : Pneumonie, méningite, cariarctivité, sépticémie [26].

IV-C-1-4. Épidémiologie:

L'homme et les animaux sont des réservoirs naturels des streptocoques [1], chez lesquels elles peuvent être responsables d'infection de gravité variable [26]. L'incidence de ces infections streptococciques varie avec la zone géographique, la

saison et l'âge du malade, dont elle est plus élevée chez les enfants, et représente principalement par l'impétigo qu'est associée à des lésions cutanées mineures[39].

Une contamination humaine a rarement été décrite, après la consommation de lait non pasteurisé provenant d'une vache atteinte d'une ma: mite [24].

Partie ⁰ (II)

Etude expérimentale

Matériel et méthodes

I. Matériel et Méthodes :

L'ensemble de notre étude a été réalisé au laboratoire de microbiologie et celui de biochimie de l'université de JIJEL.

I-1. Matériel :**I-1-1. Matériel bactériologique :**

Notre travail a porté sur l'étude de 20 souches bactériennes :

-10 souches des Entérobactéries à savoir, 5 souches *Echerichia* et 5 souches *Salmonella*.

-5 souches de *Staphylococcus*.

- 5 souches de *Streptococcus*.

Les souches utilisées proviennent de notre laboratoire de microbiologie.

I-1-2. Matériel végétal :

Les alcaloïdes utilisés ont été extraits au niveau de laboratoire de biochimie à partir de la plante *Hyoscyamus albus* (feuilles, fleurs et tiges).

La plante a pour origine la région de JIJEL (L'arayeche).

I-1-3. Milieux de culture :

Il existe de nombreux milieux qui permettent le développement, la conservation, l'isolement et la sélection des microorganismes choisis.

On a porté pour réaliser notre travail les milieux suivants :

- gélose nutritive : pour *Streptococcus*.
- gélose Hektoen : pour *Escherichia* et *Salmonella*.
- gélose Chapman : pour les *Staphylococcus*.
- gélose Muller Hinton : pour tester l'effet des alcaloïdes sur les souches bactériennes utilisées.
- eau physiologique : pour la préparation de l'inoculum.
- bouillon nutritif pour la revivification des souches.
- milieu mannitol mobilité.

- milieu TSI.
- milieu citrate de Simmons.
- milieu eau peptone exemple d'indole.
- milieu urée-indole.
- milieu Clark et Lubs.
- milieu nitrate.
- milieu Moeller additionné de - Argénine.
 - Ornithine.
 - Lysine.

I-1-4. Les réactifs :

- Violet de gentiane
 - Lugol
 - Fushine
 - Huile de cèdre.
- } pour la réalisation de la coloration de GRAM.
-
- VPI
 - VPII
- } Pour mettre en évidence l'acétoïne.
- Kovacs : pour mettre en évidence la présence d'indole.
 - Rouge de méthyle : pour mettre en évidence la présence des acides mixtes.
 - Nitrate réductase I
 - Nitrate réductase II
- } pour mettre en évidence la présence de nitrite.

La composition des milieux de culture et des réactifs utilisés sont cités dans l'annexe.

I-1-5. Autres matériel :

On a utilisé un autre matériel pour la réalisation de notre travail et qui est le suivant :

- les boîtes de Pétri.
- l'anse de platine.

- les pipettes Pasteur.
- les micropipettes (50ul).
- bain marie, étuve et microscope optique.

I-1-6. Matériel d'extraction des alcaloïdes :

Pour l'extraction des alcaloïdes on a utilisé les solutions suivantes :

- l'hydro-ethanol de 70%.
- acide chlorhydrique HCl (0,1N).
- chloroforme
- hydroxyde de sodium NaOH (0,1N).

On a utilisé aussi :

- rota- vapeur : pour l'évaporation sous pression réduite et à $T_{\leq 40}^{\circ}\text{C}$.
- ampoule à décantation : pour la séparation des alcaloïdes à d'autres composées.

I-2. Méthodes :

I-2-1. Méthodes de l'étude bactériologiques :

I-2-1-1. Revivification des souches :

A partir de chaque tube provenant de notre laboratoire (Gélose de conservation), on prélève une oèse de culture et on la dépose dans un tube contenant le bouillon nutritif. On incube les tubes à 37°C pendant 24 heures.

I-2-1-2. Isolement des souches :

L'isolement des colonies des entérobactéries s'effectue sur un milieu sélectif « gélose Hektoen », les *Staphylococcus* sur milieu Chapman et les *Streptococcus* sur la gélose nutritive.

La méthode d'isolement consiste à tremper une anse dans la culture dans le BN et de la décharger au bord de la boîte de Pétri.

L'isolement se fait par épuisement en quatre quartiers.

I-2-1-3. Purification des souches :

On prend une colonie suspecte pour chaque souche utilisée à partir du milieu d'isolement et on la dépose sur le bord de la boîte de pétri contenant le milieu Hektoen pour les entrobactéries, le milieu Chapman pour *Staphylococcus* et la gélose nutritive pour *Streptococcus*.

L'ensemencement se fait par des stries perpendiculaires du haut en bas.

I-2-1-4. Identification des souches utilisées [18] [12] [16] :**I-2-1-4-1. Identification morphologique :**

L'étude morphologique des bactéries nécessite la préparation d'un frottis coloré selon les méthodes : coloration simple, ~~coloration simple~~
coloration de GRAM

Coloration de GRAM des bactéries :**But :**

Par cette coloration on peut remarquer le mode de regroupement, la morphologie et l'affinité tinctoriale des bactéries.

Principe :

La coloration de GRAM dépend de la structure particulière de la paroi cellulaire de chacun des deux groupes des bactéries :

Les bactéries à GRAM négatif ont une paroi composée d'une couche de peptidoglycane peu épaisse, surmontée d'une couche très riche en lipides, alors que les bactéries à GRAM positif possèdent uniquement une couche de peptidoglycane.

Les colorants (violet de gentiane et Lugol) pénètrent les deux types des cellules en formant des complexes qui peuvent être solubilisés par l'alcool. Chez les GRAM négatif, ces complexes formés par le violet de gentiane sont alors perdus, donc les cellules décolorées deviennent accessibles et absorbent la Fuschine qui les recoloré en rose.

Par contre la paroi des bactéries à GRAM positif garde leur coloration initiale violette.

Technique :

- On a prélevé une goutte de la suspension bactérienne puis on a étalée sur lame.
- On a laissé sécher en flambant légèrement jusqu'au séchage complet (fixation par la chaleur).
- La lame est recouverte de solution de violet de gentiane, on a laissé agir 01 minute.
- On a ajouté le mordant (Lugol) et on laisse agir pendant 1 minute.
- Décoloration de l'étalement bactérienne par l'alcool acétone pendant 30 seconde.
- Lavage à l'eau courante.
- La recoloration de la préparation par la Fuschine diluée et prête à l'emploi 1 minute.
- Rinçage abondamment, séchage et observation à l'objectif 100 (à immersion).

Lecture:

- Celles qui retiennent le violet de gentiane après lavage à l'alcool sont GRAM positif
- Celles qui sont décolorées et prennent ensuite la couleur d'un second colorant sont dites GRAM négatif.

I-2-1-4-2. Identification biochimique :

Les tests biochimiques sont indispensables à l'identification d'une bactérie. Ils reposent principalement sur la recherche des enzymes responsables d'un métabolisme bactérien, Parmi les tests d'identification biochimique des entérobactéries (*Escherichia*, *Salmonella*), nous avons réalisés les tests suivants :

I-2-1-4-2-1. Métabolisme glucidique :**a-Attaque du mannitol :****But :**

Le milieu mannitol-mobilité permet de rechercher simultanément la fermentation du mannitol et la mobilité bactérienne.

Principe :

Le mannitol est un produit dérivé du D-mannose, sa dégradation est conduite à la formation des acides à chaîne très courte comme l'acide acétique et l'acide formique.

Technique :

On a ensemencé le milieu par piqueur central au fil droit à partir d'une culture pure puis incubé à 37°C pendant 24h.

Lecture :

L'attaque de mannitol se traduit par le virage du rouge au jaune de l'indicateur (acidification de milieu).

➤ La mobilité des germes se traduit par l'envahissement plus ou moins grand de la totalité du milieu à partir de la piquer d'incubation.

b- Fermentation des sucres en milieu TSI :**But :**

Le milieu TSI permet la mise en évidence de plusieurs enzymes qui sont responsables de la dégradation de glucose, lactose et des acides aminés, ainsi que le dégagement de gaz et la production d'H₂S.

Principe :

En anaérobiose relative, c'est à dire au niveau du culot, le glucose quoique en proportion plus faible, est utilisé préférentiellement. La fermentation du glucose provoque une acidification du culot, ce qui entraîne un virage au jaune de l'indicateur coloré. Cette dégradation du glucose peut s'accompagne d'une production de gaz mise en évidence par quelques bulles ou par une poche de gaz qui décolle complètement le milieu de fond du tube.

En aérobiose relative, c'est à dire sur la pente, l'utilisation du glucose entraîne toujours dans un premier temps une acidification de tout le milieu. Le glucose en faible proportion est vite consommé, si les bactéries n'attaquent pas le lactose, cette acidité est vite neutralisée en aérobiose / par contre, si les bactéries attaquent le lactose, l'acidité est suffisante et la pente vire au jaune.

Le citrate ferrique sert d'indicateur d' H_2S réduit, il se transforme en sulfure noir.

Technique :

On a ensemencé le milieu par piqûre centrale du culot au fil droit, suivit par des stries superficielles sur la pente puis incubé à $37^{\circ}C$ pendant 24h.

Lecture :

Après l'incubation le milieu est examiné :

- glucose fermenté : le culot vire au jaune.
- production de gaz, se traduit par la formation des bulles de gaz dans la masse de milieu et contre les parois .ou une poche gazeuse repoussant la totalité du milieu vers le haut.
- lactose est fermenté : la pente vire au jaune.
- les peptones et les acides aminés sont dégradés, la pente vire au rouge.
- production des sulfures d'hydrogène (H_2S) aux dépens des acides aminés à radicaux.
- la présence d'hyposulfite de sodium et du sulfate ferreux ammoniacal entraîne la formation de sulfure de fer qui est un composé de couleur noir.

I-2-1-4-2-2. Caractérisation des divers types fermentaires :

Divers tests permettent de caractériser des types fermentaires :

a- Réaction au rouge de méthyle (RM) :

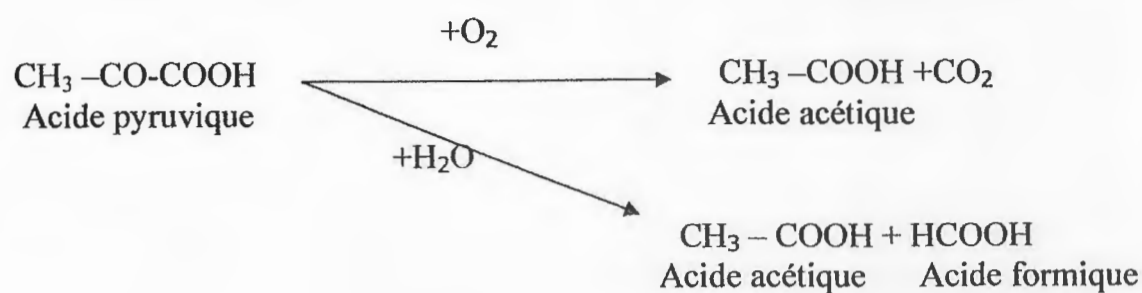
But :

Cette réaction permet de différencier la fermentation acide mixte de la fermentation butylène glycolique chez les entérobactéries.

→ la formation d'ammoniaque provient de la dégradation des acides aminés, par contre

Principe :

La réaction au rouge de méthyle permet de caractériser la fermentation acide mixte que ce soit en aérobiose ou en anaérobiose, on obtient à partir de l'acide pyruvique des acides organiques à courtes chaînes :



Lorsqu'ils sont produits, ces acides organiques maintiennent le pH de la culture à un degré suffisamment bas pour que le rouge de méthyle garde sa coloration rouge (pH < 5).

Technique :

On aensemencé le milieu de Clark et Lubs et incubé à 37 °C pendant 24h.

Après l'incubation, on a ajouté quelques gouttes d'une solution de rouge de méthyle.

Lecture:

- Le réactif reste rouge quand le pH est inférieur à 5 (pH < 5) ce qui traduit une production d'acide et on note RM (+).
- Dans le cas contraire il vire au jaune : RM (-).

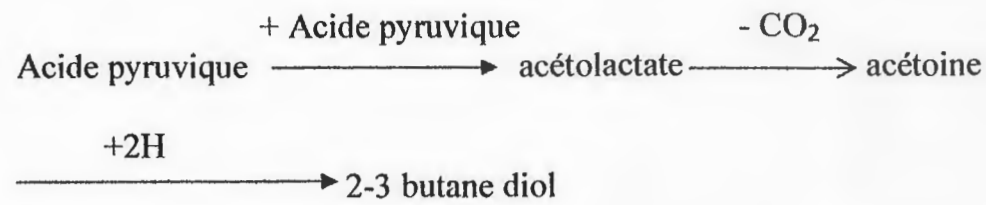
b- Réaction de Voges-Proskauer (VP) :**But :**

Elle permet la mise en évidence de l'acétyl carbinol (ou acétoïne) .

Principe :

La réaction de Voges-Proskauer permet de caractériser la présence d'acéth-méthyl-carbinol = acétoïne qui est un corps intermédiaire dans la formation du butylène glycole (2-3butane diol).

La suite des réactions conduisant au 2-3 butane diol peut être schématisée de la manière suivante :



En présence d'une hydroxyde (soude ou potasse), l'acétoïne s'oxyde à l'air pour donner du di-acétyl :



Ce dernier forme un complexe coloré en rose avec les composés guanidiques de la peptone. La réaction est plus sensible et plus rapide en présence d' α naphthol.

Technique :

On aensemencé le milieu de Clark et Lubs et incubé à 37 °C pendant 24h.

Après l'incubation, on a ajouté quelques gouttes d'une solution alcoolique d' α naphthol et quelques gouttes d'une solution aqueuse de soude à 16%. Agiter et laisser reposer.

Lecture :

L'apparition d'une coloration rose-rouge en surface se traduit par la présence de l'acétoïne : VP (+).

-Aucun changement de coloration : VP (-).

I-2-1-4-2-3. Étude de métabolisme d'acide organique :

-Utilisation du citrate de Simmons :

But :

Le milieu citrate de Simmons permet la recherche du citrate (1^{er} intermédiaire du cycle de Krebs).

Principe :

Certaines bactéries sont capables d'utiliser l'ion citrique comme unique source de carbone. De telles bactéries sont aptes à cultiver sur des milieux synthétiques dont la seule source de carbone est constituée par citrate de sodium. Cette croissance peut

s'accompagne d'une libération d'ammoniaque d'où, le plus souvent, alcalinisation du milieu qui se traduit par le virage au bleu de l'indicateur (bleu de bromothymol).

Technique :

On a ensemencé le milieu en surface par stries longitudinales, et incubé à 37°C pendant 24h.

Lecture :

- Citrate (+) : culture abondante avec, en général, bleuissement du milieu.
- Citrate (-) : ni culture ni bleuissement.

I-2-1-4-2-4. Métabolisme protéique :

Elle consiste en l'étude de la dégradation des substances protéiques complexe telle gélatine ou la caséine ou en celle de divers acides aminés.

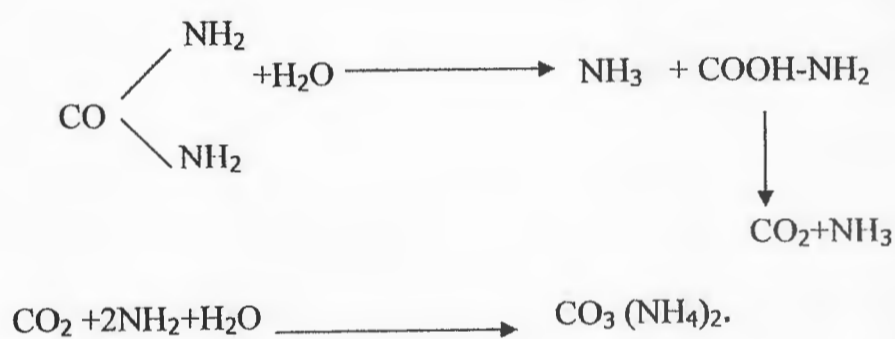
a- Recherche d'une uréase :

But :

Ce test permet de déterminer les germes qui utilisent l'urée comme source d'énergie (la présence d'uréase).

Principe :

Certaines bactéries possèdent une uréase très active transforment l'urée en ammoniac, et en carbonate d'ammonium



Cette réaction se traduit par une alcalinisation du milieu décelable par un indicateur coloré.

Technique :

On a fait une culture sur milieu liquide de Fergusson (urée –indol),
Puis incubé à 37 °C pendant 24h.

Lecture :

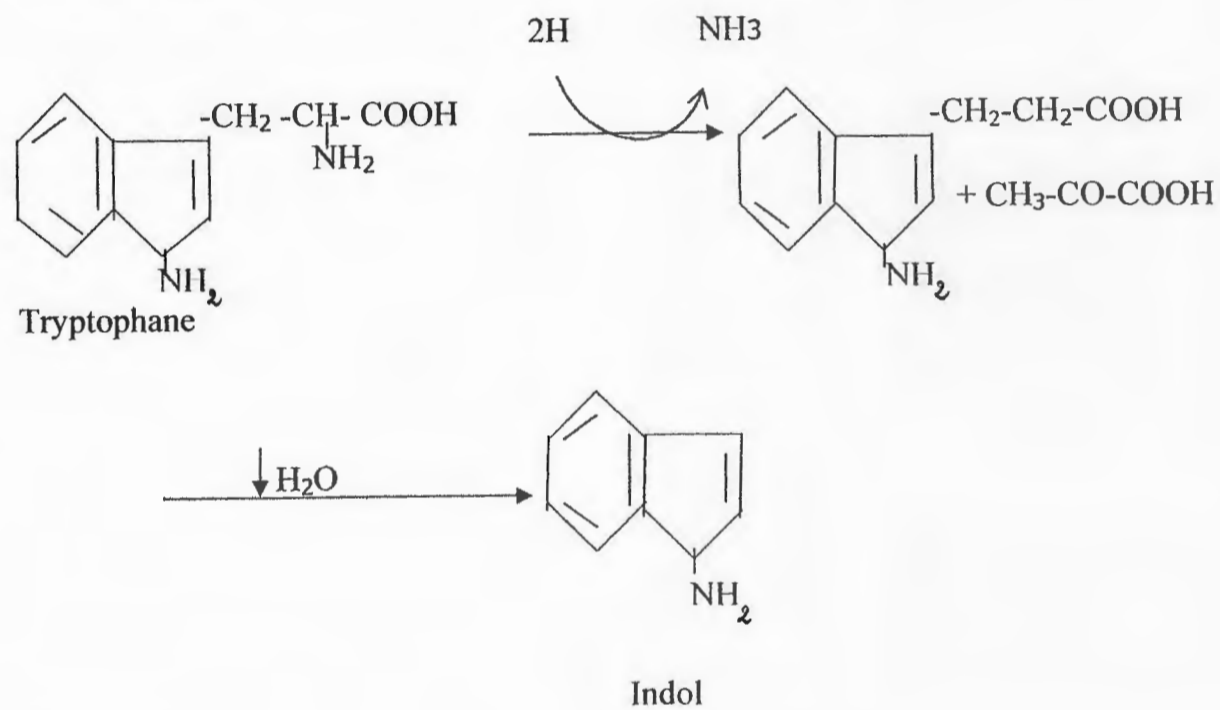
- Le virage de l'indicateur de pH au rouge violacée Prouve la dégradation de l'ammoniac et production de carbonate d'ammonium qui induisent l'alcalinisation du milieu : uréase (+).
- Pas de changement de teinte : uréase (-).

b- Recherche d'indole :**But :**

Il s'agit de déterminer si un micro-organisme est capable de dégrader du tryptophane et produire l'indole.

Principe :

Certaines bactéries désaminent et hydrolysent le tryptophane jusqu'au stade indole :

**Technique :**

On a ensemencé le milieu d'eau peptoné exemple d'indole à partir d'une suspension bactérienne, puis incubé pendant 24h à 37°C.

Lecture :

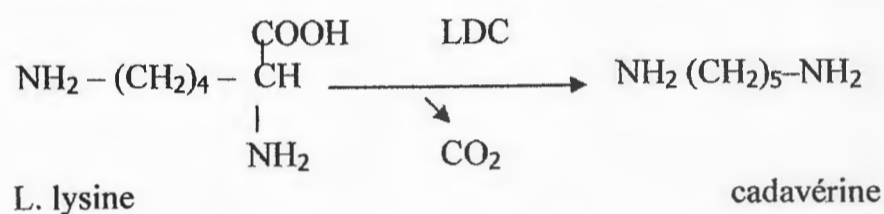
- L'indole en présence de réactif d'Erlich-kovacs, donne un anneau rouge en milieu acide : indole (+)
- L'apparition d'un anneau jaune ou brunâtre : indole (-).

C- Dégradation des acides aminés :**But :**

Certaines espèces microbiennes possèdent des enzymes capables de dégrader certaine ammino-acide, la mise en évidence de ces enzymes est utilisée de point de vu taxonomique, en particulier pour les entérobactéries et les *pseudomonas*.

-Recherche de la lysine décarboxylase (LDC) :**Principe :**

Certaines bactéries possèdent une décarboxylase qui agit sur un acide aminé particulier, la lysine, en produisant la cadaverine

**Technique :**

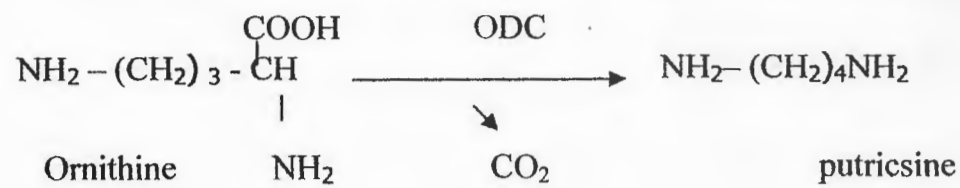
Le milieu de Moeller enrichi de lysine estensemencé par la culture et incubé à 37°C pendant 24 h.

Lecture :

- La cadaverine réagit avec la ninhydrine en donnant une coloration violette : LDC (+).
- L'absence de LDC se traduit par le virage de la couleur au jaune.

- Recherche d'ornithine décarboxylase (ODC) :**Principe :**

La dégradation de l'ornithine conduit au putrescine et libération de CO₂ :

**Technique:**

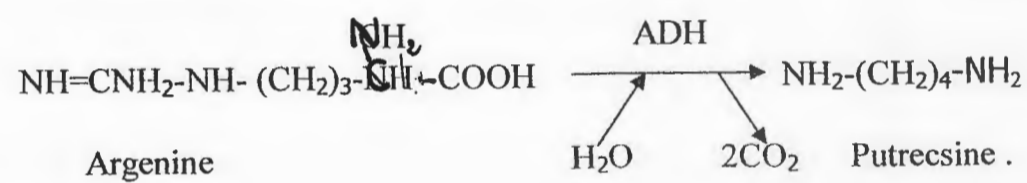
Le milieu de Moeller enrichi de l'ornithine est ensemencé par la culture et incubé à 37°C pendant 24h.

Lecture :

- La putrescine réagit avec la ninhydrine on donnant une coloration violette : (ODC +)
- L'absence de l'ODC se traduit par le virage de la couleur au jaune.

-Recherche de l'argénine déshydrogénase (ADH) :**Principe :**

L'argénine est décarboxylée en agmatine, puis hydrolysée en putrescine.

**Technique:**

Le milieu Moeller enrichi de l'argénine est ensemencé par une culture fraîche et incubé à 37°C pendant 24 h.

Lecture :

L'apparition d'une couleur violette témoigne la présence d'un ADH.

I-2-1-4-2-5. Recherche de nitrate réductase :**But :**

Recherche de nitrate réductase.

Principe :

Certaines bactéries peuvent réduire Les nitrates NO_3 en nitrites NO_2 grâce à des enzymes. Quand la réaction négative on, a deux éventualités:

- Ou bien les nitrates ont d'abord été réduits en nitrite NO_2 . Mais la réduction est peut suivre jusqu'au stade N_2 ou NH_2 .
- Ou bien les nitrates n'ont pas été réduits et se trouve donc un bouillon nitrate, dans ce dernier cas en réduit chimiquement par de la poudre de zinc, les nitrates en nitrite.

Technique :

On aensemencé le bouillon nitrate par une suspension bactérienne et incubé à 37°C pendant 24h.

Lecture :

On a ajouté quelques gouttes de nitrate réductase I (acide sulfanilique) et quelques gouttes de nitrate réductase II (alpha-naphtylamine)

- Si le milieu devient rose on rouge : nitrate réductase (+).
- Si le milieu reste incolore, ajouter une pincée de zinc :
 - Si une teinte rose ou rouge apparaît, les nitrates n'ont pas été réduits par les bactéries : nitrate réductase (-).
 - Si le milieu reste incolore les nitrates ont été réduits au delà du stade nitrite : les bactéries sont nitrate réductase (+).

I-2-1-4-2-6. Recherche d'une Catalase :**Principe :**

Les catalases sont des ferroporphyrines de poids moléculaires élevé et existent chez les bactéries aérobies. Elles leur permettent de vivre en présence d' O_2 et en présence de la production de peroxyde d'hydrogène lors du phénomène respiratoire.

Ces enzymes décomposent l'eau oxygénée en H_2O avec dégagement d'oxygène

Catalase

**Technique :**

Sur une lame de verre, on a ajouté une goutte d'eau oxygénée, puis on a ajouté une anse de culture étudiée.

Lecture :

Le test positif se traduit par un dégagement gazeux (O_2) sous forme des bulles d'air. Il révèle la présence d'une catalase chez ces bactéries.

I-2-2. Méthode d'extraction des alcaloïdes à partir de la plante *H. albus* [4] :

Il faut noter que la plante *H. albus* a été traitée par différentes doses de phytohormones (voire tableau N°3); et sur cette base nous avons choisie les neufs extraits.

Tableau N°3: Les différentes doses des phytohormones.

Lot \ Dose de phytohormone	1	2	3	4	5	6	7	8	9
IAA	00	10	00	10	00	20	10	20	20
BAP	00	00	10	10	20	00	20	10	20

D'après BALBA A., 1981 ; les étapes de l'extraction des alcaloïdes sont les suivantes :

1- Préparation de la plante :

- **Séchage** : toutes les parties de la plante *H.albus* ont été séchées à l'air libre pendant 6 jours, puis dans l'étuve et le four à 40°C pendant 4 jours.

- **Broyage** : le broyage de la plante a été procédé à l'aide d'un mixeur jusqu'à l'obtention d'une poudre.

2- Extraction hydro-ethanolique :

La mise de 5g de la poudre dans un bécher avec 50 ml de l'éthanol dilué à 70% (30ml d'eau distillée + 70ml d'éthanol), on ferme le bécher et le laisse macérer pendant 24 heures.

Cette opération est répétée deux fois pour extraire une grande quantité des alcaloïdes. Chaque opération dure 24 heures.

Filtration : la filtration du mélange hydro-ethanolique a été réalisée par le papier filtre, cette opération permet de récupérer les substances organiques et notamment les alcaloïdes.

3- Evaporation à sec :

L'évaporation se fait dans le but de séparer l'extrait sec de la phase aqueuse et ce-ci se réalise au rota vapeur sous pression réduite à la $T^{\circ} = 40^{\circ}\text{C}$.

Dans l'étape suivante, on a ajouté 5 ml de l'acide chlorhydrique (HCl : 0,1N) dans la fiole d'évaporation pour reconstituer le concentrat qui est attaché à sa paroi, on agite le mélange sans faire des bulles, puis on le met dans un flacon.

Cette opération est répétée deux fois, le mélange obtenu est filtré afin d'éliminer les impuretés. Le volume final de l'extrait est de 15 ml est l'appel : la phase aqueuse.

4- Affrontement par le chloroforme :

Étape 1 : afin d'éliminer les lipides et les autres substances lipophiles dans une ampoule à décontation on a ajouté 5 ml de chloroforme à la phase aqueuse.

Après agitation énergique et repos de 5 min deux phases sont obtenues

-une phase chloroformique en bas contenant les lipides et les substances lipophiles.

-une phase aqueuse acide en haut contenant les alcaloïdes.

La phase chloroformique est récupérée dans un bécher, alors que la phase aqueuse est soumise à une 2^{ème} extraction par le chloroforme afin d'éliminer le maximum des lipides.

Étape 2 : la phase chloroformique déjà récupérée dans la 1^{ère} étape, on l'a ajoutée 5 ml d'HCl, après une agitation énergique et repos de 5 min, on trouve deux phases :

- la phase chloroformique en bas.
- La phase aqueuse en haut.

La phase chloroformique est remise dans un flacon à descendre afin de procéder à une 2^{ème} extraction par l'HCl dans le but que cette phase ne contient plus d'alcaloïdes, alors que la phase aqueuse est récupérée dans un bécher.

On mélange les solutions aqueuses acides obtenues dans la 1^{ère} et la 2^{ème} étape.

Étape 3 : les solutions aqueuses acides obtenues sont alcalinisées par l'addition de quelques gouttes de NaOH (1 N), donc les alcaloïdes deviennent libres dans ces solutions.

Dans un flacon à décontation on ajoute 10 ml de chloroforme à la solution aqueuse alcaline, après agitation énergique et repos de 5 min, deux phases sont obtenues :

- la phase chloroformique en bas.
- la phase aqueuse alcaline en haut.

La phase aqueuse est remise dans un flacon à descendre afin de procéder à une 2^{ème} et 3^{ème} extraction par le chloroforme pour récupérer le maximum d'alcaloïdes, alors que la phase chloroformique est récupérée dans un bécher.

5- Evaporation à sec :

En fin, le solvant organique contenant les alcaloïdes bases a été évaporé au rota- vapeur sous pression réduite à la T°= 40°C jusqu'à l'obtention d'un résidu sec : les alcaloïdes totaux, ce dernier a été récupéré par l'addition de 10ml de éthanol dilué à 30%.

I-2-3. Méthode de test de sensibilité :**I-2-3-1. Préparation du milieu de culture :**

On coule la gélose Muller- Hinton en boîtes de Pétri sur une épaisseur de 4 mm et on laisse refroidir.

Avant l'utilisation des géloses, on doit les sécher 15 min à 37°C dans l'étuve.

I-2-3-2. Préparation de l'inoculum :

A partir des souches pures à étudier (*Salmonella*, *Escherichia*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*), on prélève une ôse de culture et on la trempe dans un tube contenant le bouillon nutritif. On incube les tubés à 37°C pendant 24 heures.

Après incubation, on dilue à l'aide d'une anse dans 10ml d'eau physiologique stérile et on homogénéise la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0,5 MC Farland.

I-2-3-3. Ensemencement par inondation :

On inonde la surface de la gélose par la suspension bactérienne de façon à recouvrir cette dernière.

Des mouvements de rotation dans les deux axes par la main accélèrent le recouvrement.

A l'aide d'une pipette Pasteur, on aspire la totalité du liquide.

Les boîtes ainsi ensemencées sont mises à sécher 15 min à 37°C.

I-2-3-4. Confections des puits :

On confectionne 9 puits (pour les souches de *Salmonella*, *Escherichia* et *Staphylococcus*) et 3 puits (pour les souches de *Streptococcus*) dans chaque boîte de Pétri déjà ensemencée, puis on dépose deux gouttes de la gélose stérile au fond de chaque puits pour boucher la base de ces derniers.

I-2-3-5. Préparations des dilutions :

La préparation des dilutions des alcaloïdes et celles de l'extrait brut de *H. albus* est réalisée dans l'éthanol dilué à 30% comme il est indiqué au tableau 4 :

Tableau N°4 : Préparation des dilutions des alcaloïdes et celles de l'extrait brut de *H. albus* dans l'éthanol dilué (30%).

Dilution	Volume du diluant (µl)	Volume d'alcaloïdes (µl)	Volume total (µl)	Numération des puits.
Extrait brut				
1/1	0	300	300	1
1/2	300	300	600	2
1/3	600	300	900	3
Extrait alcaloïdes				
1/1	0	300	300	1
1/2	300	300	600	2
1/3	600	300	900	3

I. 2.3.6. Application des dilutions:

A partir de chaque dilution, on prend 50 µl et on la dépose dans le puit correspondant, puis on incube à 37°C pendant 24 h.

Résultats et discussion

II. Résultat et discussion :

II-1. Etude bactériologique :

Les résultats de l'étude bactériologique, nous ont permis d'isoler, de purifier et identifier 5 souches de *Escherichia*, 5 souches de *Staphylococcies*, 5 souches de *Streptococcies* et 5 souches de *Salmonella*.

Le tableau N° : 5 et 6 (fig. N° : 5 et 6) regroupe les résultats des profils biochimiques des souches d'*Escherichia* et celles de *Salmonella*.

Ces résultats ont montré que la plupart des souches d'entérobactéries étudiées ont le même profil biochimique, mais certaines d'entre elles présentent quelques tendances métaboliques variables.

La figure N° : 7 et 8 représente les colonies des souches d'entérobactéries étudiées sur milieu Héктоen.

En ce que concerne les souches cultivées sur milieu Chapman et gélose nutritive, nous avons réalisés uniquement la coloration de GRAM et le test catalase, il faut noter que ces souches sont isolées et identifiées lors de la réalisation de mémoire de fin d'étude (Zaiman S., Harat H. et Boudriaat C., 2005)

Les résultats obtenus révèlent que :

- les souches cultivées sur milieu Chapman (fig. N° : 9) sont des cocci arrondis à GRAM+, isolés en courtes chaînettes, ou en amas irréguliers, catalase+ ; ce sont des *Staphylococcus*.

- les souches cultivées sur gélose nutritive (fig. N° : 10) sont des cocci arrondies, à GRAM+, isolés en chaînettes plus au moins longues, catalase-; ce sont des *Streptococcus*.

Tableau 5 : Les tests d'identification des souches d' *Escherichia* :

Tests Souches	GRAM	ADH	LDC	ODC	VP	RM	Citrate	Indole	uréase	Nitrate Réductase	Mannitol Mobilité		TSI			
											Man	MOB	H ₂ S	GAZ	LAC	GLU
S ₁	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+
S ₂	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+
S ₃	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+
S ₄	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+
S ₅	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+

(+) : test positif

(-) : test négatif

Tableau 6 : Les tests d'identification des souches de *Salmonella* :

Tests Souches	GRAM	ADH	LDC	ODC	VP	RM	Citrate	Indole	uréase	Nitrate Réductase	Mannitol Mobilité		TSI			
											Man	MOB	H ₂ S	GAZ	LAC	GLU
S ₁	-	+	+	-	-	+	+/-	-	-	+	+	+	+	-	+	
S ₂	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	
S ₃	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	
S ₄	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	
S ₅	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	

(+) : test positif

(-) : test négatif



**Fig. N° 05 : Profil d'identification biochimique
d'*Escherichia***



**Fig. N° 06 : Profil d'identification biochimique de
*Salmonella***



Escherichia

Fig. N° 07 : Aspect des colonies *d'Escherichia* sur milieu Hektoen



Salmonella

Fig. N° 08: Aspect des colonies *Salmonella* sur milieu Hektoen



Fig. N° 09: Aspect des colonies *Staphylococcus* sur milieu Chapman

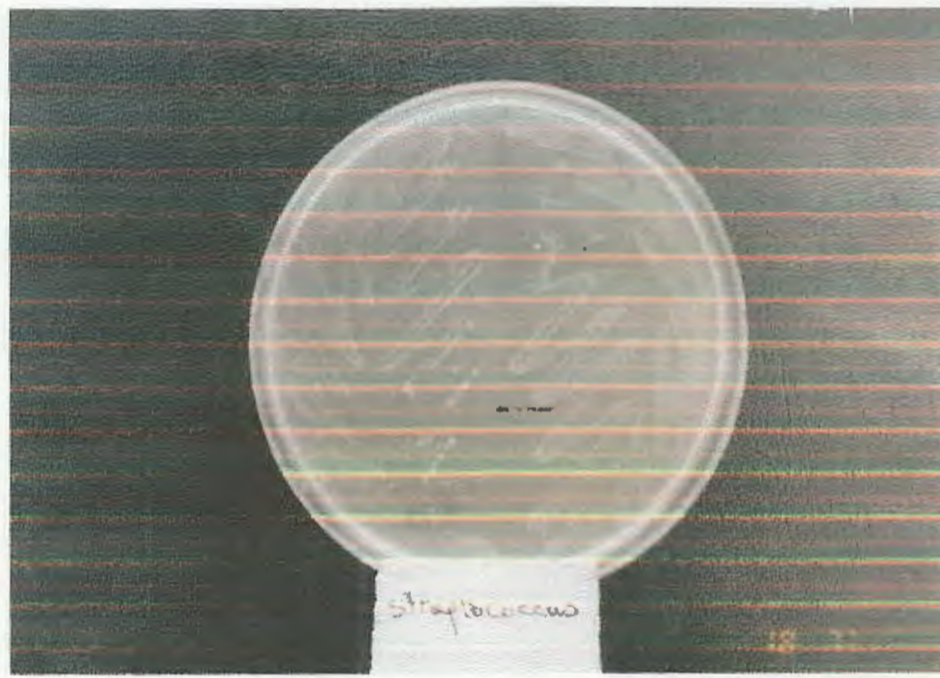


Fig. N° 10: Aspect des colonies *Streptococcus* sur la Gélase nutritive

II-2. Test de sensibilité :

Les alcaloïdes, métabolites secondaires présents dans plusieurs plantes et les algues, ont montrés diverses activités thérapeutiques telle l'activité antifongique, antiparasitaire, antibactérienne et même par fois antitumoral [9] [22].

L'activité antibactérienne de ces alcaloïdes est au centre des études. Sur les mêmes conditions d'extraction nous avons extraits les alcaloïdes de la plante *H.albus* et testés leurs effet sur les 20 souches étudiées.

Les résultats de test de sensibilité des souches utilisées sont résumés dans le tableau N° : 7 pour l'extrait brut et tableau N° : 8 pour l'extrait d'alcaloïdes de la plante *H.albus*.

Ces résultats révèlent une résistance totale pour les cinq souches d'*Escherichia* (fig. N° 11), les cinq souches de *Salmonella* (fig. N° 12) et celle de *staphylococcus* (fig.N°13) vis-à-vis des 9 extraits bruts et ceux des alcaloïdes de la plante *H.albus*.

Ces résultats sont en accorde avec celle de **GUIDA A. et al, 2001** pour les alcaloïdes extrait de la plante *Tabemaemontano catharinesis ADC* .

Par contre les travaux de **B.Sener et al, 1999** et de **JL.Mensah et al, 1990** ont montrés successivement que les alcaloïdes extraits à partir de la plante *Turkish geophytes* ont un effet sur *Salmonella* et *Staphylococcus*, alors que les alcaloïdes extraits de la plante *Phyllanthus Discoideus* ont un effet sur *Escherichia*.

Pour les souches de *Streptococcus* les résultats obtenus montrent que certaines souches sont résistantes vis- à- vis des 9 extraits bruts (fig. N°14) et ceux des alcaloïdes de la plante *H.albus*, mais certaines souches ont montrés une sensibilité uniquement aux extraits bruts 7 , 8 et 9 (fig. N°14) et ceux des alcaloïdes de la plante *H.albus* qui est traitée par de différentes doses des phytohormones ; la dose des extraits 7 , 8 et 9 est représentée dans le tableau N°3.

Cela prouve que le traitement par les phytohormones est à l'origine d'une déviation métabolique que des travaux ultérieurs vont élucider.

Les résultats de détermination de degré de sensibilité des souches S₁, S₂, S₄, S₅, de *Streptococcus* (tableau N° : 9 pour l'extrait brut et tableau N° :10 pour l'extrait d'alcaloïdes) ont révélés des résultats variables ; en effet les souches S₁, S₅ montrent une

sensibilité vers les extraits bruts et les extraits d'alcaloïdes des échantillons 7, 8 et 9. La souche S₄ est sensible à l'extrait brut pour l'ensemble des échantillons 7, 8 et 9. Par contre elle est résistante à l'ensemble des extraits 7, 8 et 9 d'alcaloïdes. Ce résultat pourrait être lié à la présence de molécules antibactériennes et ces molécules sont éliminées lors de la purification des alcaloïdes. Contrairement la souche S₂ est insensible à l'extrait brut, mais sensible à l'extrait d'alcaloïdes issu à partir des échantillons 7, 8 et 9.

La figure N° :15 montre les résultats des cas observés de la sensibilité des souches de *Streptococcus* aux différentes dilutions des extraits bruts et des alcaloïdes 7, 8 et 9.

Il semblerait que ces résultats sont liés à la dose d'alcaloïdes obtenue après l'extraction, soit au mode de vis et le métabolisme des souches bactériennes testées.

Les travaux de **SCAZZOCCHIOF et al, 2001** ont montrés que certaines souches de *Streptococcus* sont sensibles aux alcaloïdes extraits à partir de la plante *Hydrastis canadensis*.

Par contre les travaux de **ASIMA et al, 1999** ont montrés que certaines souches de *Streptococcus* sont résistantes vers les alcaloïdes synthétisés par la plante *Holarrhena pubescent*.

Ces résultats sont en accord avec ceux que nous avons obtenus, en effet les extraits de la plante *H.albus* traitée par différentes doses de phytohormones ont montrés une activité antibactérienne variable vis-à-vis de différentes souches de *Streptococcus* testées.

Les résultats que nous avons trouvés restent préliminaires et reste d'autres travaux pour déterminer le type moléculaire d'alcaloïde ou des alcaloïdes de la plante *H.albus* qui ont un effet antibactérien.

Les résultats de test antibactérienne de l'extrait brut ont par fois révélés des effets inhibiteurs vers les *Streptococcus*, mais le procédé de purification des alcaloïdes a éliminé les molécules antibactériennes, ce qui nous oriente à conclure que la plante *H.albus* possède des molécules antibactériennes en plus des alcaloïdes et que d'autres travaux sont nécessaires pour déterminer la nature de ces composés.

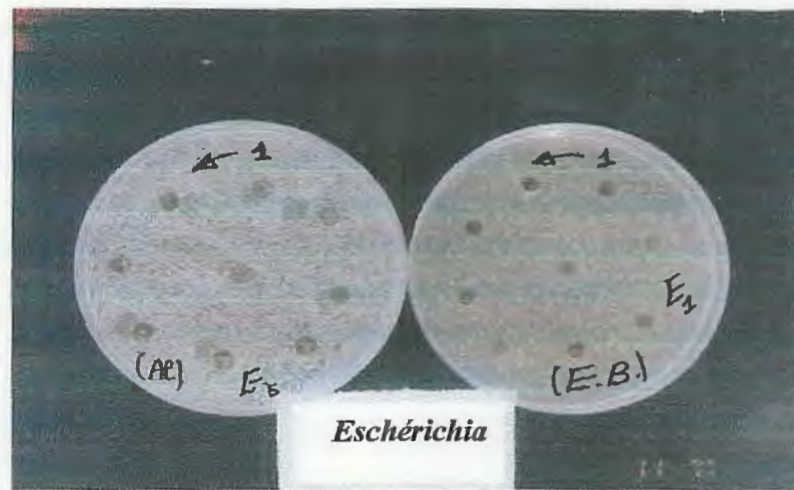


Fig. N° 11: Résultats de la sensibilité des *Escherichia* aux extraits bruts et des alcaloïdes de *H. albus*.

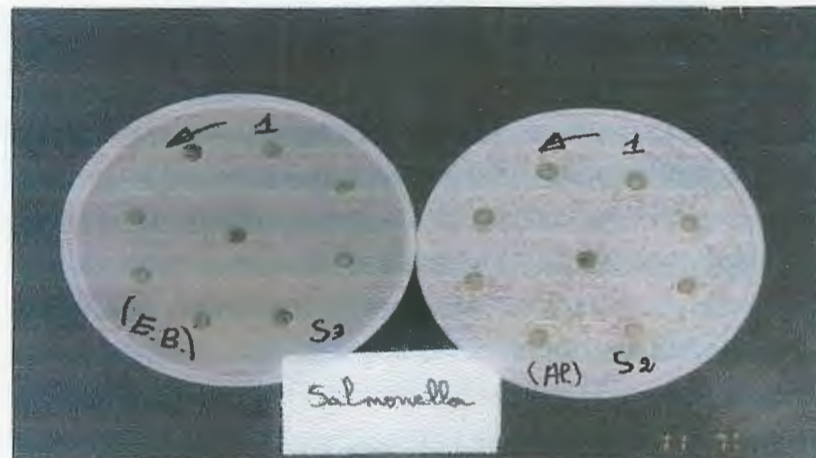


Fig. N° 12 : Résultats de la sensibilité des *Salmonelles* aux extraits bruts et des alcaloïdes de *H. albus*

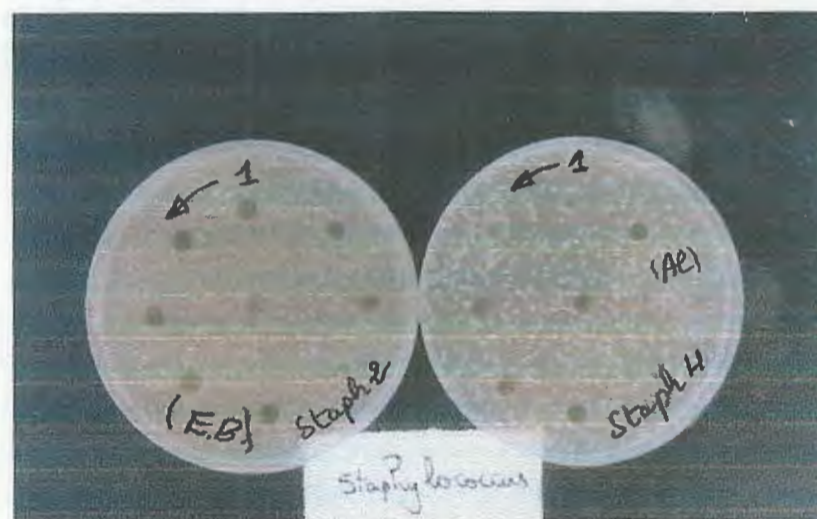


Fig. N° 13 : Résultats de la sensibilité des *Staphylococcus* aux extraits bruts et des

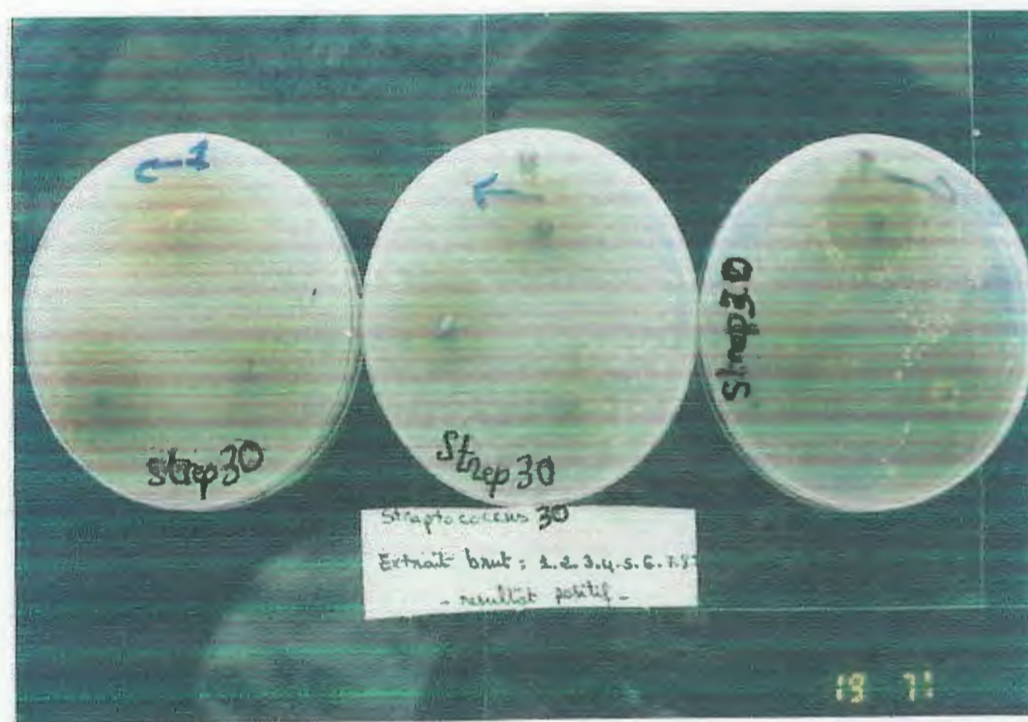
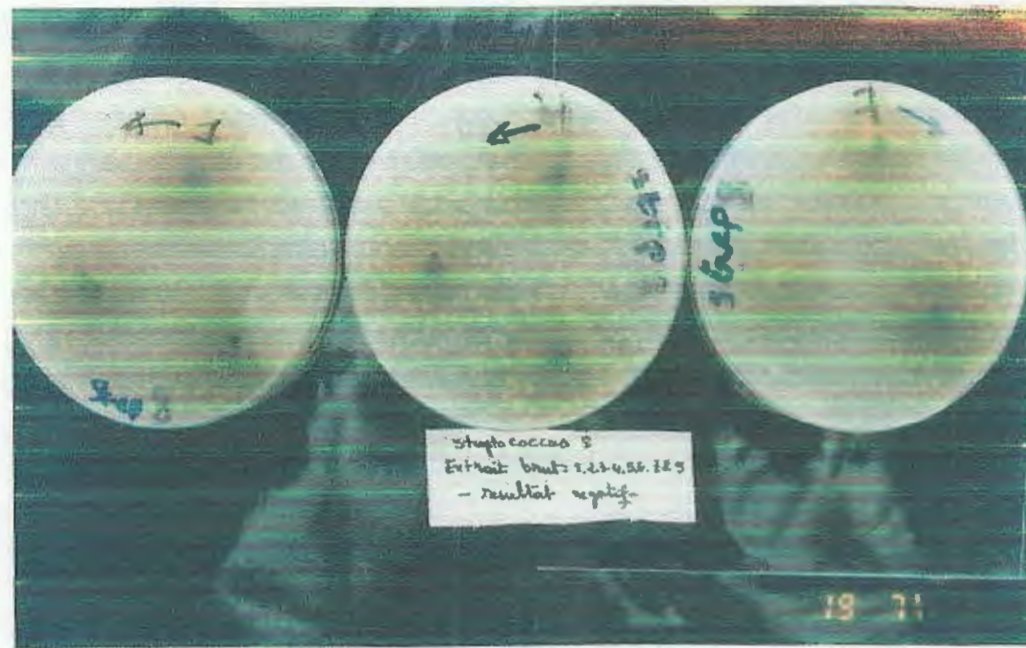


Fig. N° 14: Résultats de la sensibilité des *Streptococcus* aux extraits bruts de *H.albus*

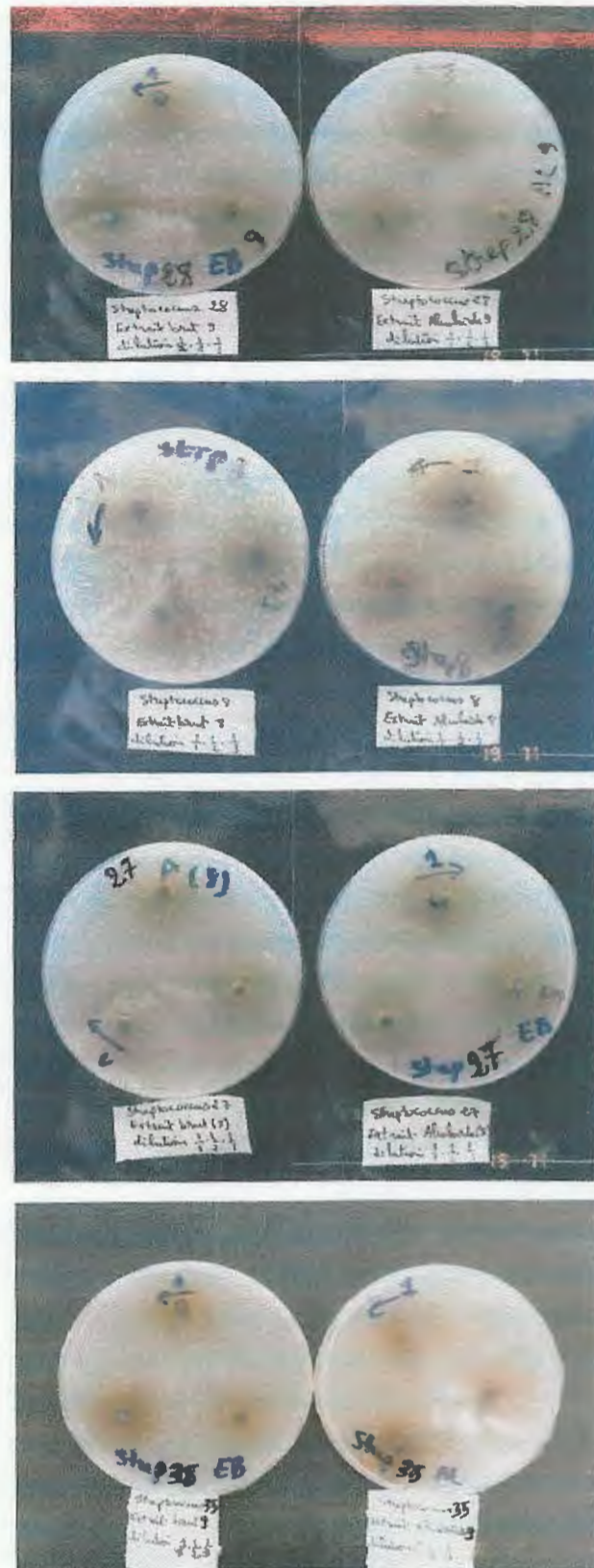


Fig N° 15 : Résultats des cas observés de la sensibilité des *Streptococcus* aux différentes dilutions des extraits bruts et des alcaloïdes (7, 8, 9) de *H.albus*

Tableau 7 : Résultats de test de sensibilité des souches utilisées vis-à-vis des 9 extraits bruts de *H.abus* :

Souches		Extrait brut	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Salmonella</i>	S ₁	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	S ₂	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	S ₃	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	S ₄	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	S ₅	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>Escherichia</i>	E ₁	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	E ₂	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	E ₃	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	E ₄	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	E ₅₁	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>Staphylococcus</i>	Staph 1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	Staph 2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	Staph 3	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	Staph 4	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	Staph 5	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>Streptococcus</i>	Strp 1	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S
	Strp 2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	Strp 3	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	Strp 4	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S
	Strp 5	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S

R : Résistance

S : Sensibilité

Tableau 7 : Résultats de test de sensibilité des souches utilisées vis-à-vis des 9 extraits d'alcaloïdes de *H.abus* :

Extrait d'alcaloïdes		Souches								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Salmonella</i>	S ₁	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	S ₂	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	S ₃	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	S ₄	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	S ₅	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>Escherichia</i>	E ₁	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	E ₂	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	E ₃	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	E ₄	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	E ₅₁	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>Staphylococcus</i>	Staph 1	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	Staph 2	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	Staph 3	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	Staph 4	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	Staph 5	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>Streptococcus</i>	Strp 1	R	R	R	R	R	R	S	S	S
	Strp 2	R	R	R	R	R	R	S	S	S
	Strp 3	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	Strp 4	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	Strp 5	R	R	R	R	R	R	S	S	S

R : Résistance

S : Sensibilité

Tableau 9 : les diamètres des zones d'inhibition (mm) des souches de *streptococcies* vis-à-vis des extraits bruts 7,8 et 9:

Extrait	Extrait brut								
	7			8			9		
Dilution	D ₁	D ₂	D ₃	D ₁	D ₂	D ₃	D ₁	D ₂	D ₃
Souches									
S ₁	19	16	15	27	19	17	29	27	19
S ₂	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S ₄	14	11	7	18	15	15	26	23	20
S ₅	35	30	25	47	41	41	50	45	24

Tableau 10 : les diamètres des zones d'inhibition (mm) des souches de *streptococcies* vis à vis des extraits d'alcaloïdes 7,8 et 9:

Extrait	Extrait d'alcaloïdes								
	7			8			9		
Dilution	D ₁	D ₂	D ₃	D ₁	D ₂	D ₃	D ₁	D ₂	D ₃
Souches									
S1	20	15	12	25	20	18	34	26	24
S2	24	19	14	26	22	17	30	27	20
S4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S5	37	32	23	46	40	35	55	50	47

Discussion générale :

Le test de sensibilité des souches purifiées et identifiées en vers des extraits obtenus à partir de différents lots de la plante *H.albus* traité par différentes doses de phytohormones, nous a révélé que : d'une part les souches d'*Eschérichia*, *Salmonella* et celles de *staphylococcus* sont résistantes à l'extrait brut et les alcaloïdes des différents échantillons, d'autre part certaines souches de *streptococcus* ont montrées une sensibilité variable en vers les extraits bruts des lots de *H.albus* 7, 8 et 9, mais il reste que les extraits d'alcaloïdes n'ont pas d'effet sur la souche S₄. De plus la souche S₂ est insensible aux composés de l'extrait brut 7, 8 et 9. Cependant il reste sensible aux extraits d'alcaloïdes.

Les résultats des travaux de SANDRO R. et al. en 2004, sur la plante *Discaria americana* ont révélé que les alcaloïdes extraits de cette plante ont un effet inhibiteur sur les bactéries Gram négatives et les bactéries Gram positives.

De plus SANSORER-PERAZA et al. en l'an 2000, ont montré l'effet antibactérien des alcaloïdes extraits de la plante *Senna rasemoza* surtout sur les *Staphylococcus aureus*.

Les alcaloïdes synthétisés par les plantes ont parfois un effet antibactérien [36], antifongique [9] et même parfois antiparasitaire [34].

Malgré les résultats obtenus, il reste que d'autres travaux sont nécessaires pour déterminer les molécules qui sont à l'origine de cette inhibition bactérienne et l'effet de traitement de *H.albus* par les phytohormones sur la synthèse des alcaloïdes et d'autres substances antibactériennes.

Il faut noter que les alcaloïdes ont par fois une cytotoxicité élevée ce qui représente un facteur limitante d'utilisation des plantes produisant des alcaloïdes en médecine [21].

Conclusion

Conclusion :

Les alcaloïdes sont connus pour leurs effets thérapeutiques, en particulier sur des cellules du système nerveux [3].

Hyoscyamus albus est l'une des plantes connue par sa richesse en alcaloïdes.

Les résultats du test de sensibilité des 9 extraits d'alcaloïdes de *H.albus*, ayant subis un traitement par des doses variables de phytohormones sur 20 souches bactériennes (5 *Escherichia*, 5 *Salmonella*, 5 *Staphylococcus* et 5 *Streptococcus*) révèlent la résistance des souches *Escherichia*, *Salmonella* et *Staphylococcus*, par contre les souches du genre *Streptococcus* ont montrés une sensibilité variable selon les souches bactériennes et les extraits d'alcaloïdes de *H.albus* 7, 8 et 9.

Les résultats retrouvés ne sont que des résultats préliminaires, d'autres travaux sont nécessaires pour identifier les alcaloïdes qui sont responsables de l'activité antibactérienne avec la détermination des CMI.

Références bibliographiques

Références bibliographiques:

- 1- AIT ABDELOUAHAB N., 2001. Microbiologie alimentaire, ed. Office des publications universitaires, 04-2001: 121-125.
- 2- ASIMA, CHAKRABORTY B., ADELHEID H., BRANTNER, 1999. Journal of ethnopharmacology, volume 68, Issue 1-3, 12-1999: 339-344.
- 3- AVRIL J.L., DABERNAT H., DENIS F., MONTEIL H., 1992. Bactériologie clinique, ed. Copyright, 1992 : 672 pages.
- 4- BAILLY L.H., 1985. Manuel of cultivated plant. The Macmillan, 1985:866.
- 5- BAUER G., LUTTGE U., KLUGE M., 1996. Botanique, 2 ed. Paris, 1996 : 212-217.
- 6- BOISSONNET B., BOISSONNET G., LARPENT J.P., 1996. Abrégé de bactériologie générale et appliquée, ed. SMER: 179-180.
- 7- BOURGEOIS C.M., MESCIE J.F., ZUCCA, 1996. Microbiologie alimentaire tome 1, 2 ed. Lavoisier, PARIS, T.I. 1996: 11-17.
- 8- BUGNICOURT M., 1995. Dictionnaire de microbiologie générale. Ellipse, ed. Moxketing S.A., 1995:991 pages.
- 9- BRUNETON J., 1993. Pharmognosie "phytochimie" plantes médicinales, ed. 1993 : 629-642.
- 10- CARAFFA N., 1999. Se soigner par les plantes herboriste. Berti, ed. 1999: 1-2.
- 11- CARBONELLE B., DENIS F., MARMANIER A., PENON G., VARGUES R., 1988. Bactériologie médicale "Techniques usuelles", Paris, 1988:105-112.
- 12- EYQUEM A., ALOUF J., MONTAGNIER L., 1998. Traité de microbiologie clinique, ed. Piccin nuova libreria, SPA. Italie, 1998 : 593-598.
- 13- FERRON A., 1979. Bactériologie médicale à l'usage des étudiants en médecine, 10 ed. Paris, 1979 : 14-21.

- 14- GUIDA A., BATTISTA G., BARGARDI S., 2003. Pharmaceutica, 2003:167-173.
- 15- GUINARD J.L., 1996. Biochimie végétal, mansson, Paris, 1996 : 225.
- 16- GUIRAUD J.P., 1980. L'analyse microbiologie dans les industries alimentaires, 2ed. Paris, 1980 : 54-76.
- 17- GUIRAUD J.P., 1998. Microbiologie alimentaire, Paris, 1998 : 80-83.
- 18- HART T., SHEARS P., 1997. Atlas de microbiologie médicale, France, 1997 : 112-117.
- 19- HILLAL S.H., ZAKIA Y., 1981. Medicinal plante constitue. Dar elkotob, 1981 : 424-431.
- 20- HOPKINS W.C., 2003. Physiologie végétale, 2 ed. Paris, 2003 : 267-268. 281-284.
- 21- IBN HAMADOUSH A.R.M., 1996. Revelation des enigmas dans l'exposition des drogues et des plantes, ed. Beirut, 1996 : 63-64.
- 22- KLEIN H.P., 1995. Microbiologie, ed. France, 1995 : 435-451.
- 23- KLEIN H.P., 2003. Microbiologie, ed. Paris, 2003 : 68-73.
- 24- LARPENT J.P., 1995. Microbiologie alimentaire, ed. Paris, 1995 : 24.
- 25- LAURENT D., AMELIE L., AURELIE W., NICOLE W., CHRISTINE M., SABINE V., 2000. European journal of pharmacology. December 2000 : 9-18.
- 26- LECLERE H., MEYER A., DERAMA J., 1999. Cours de microbiologie générale, ed. Groupe liaisons à Doin Paris, 1999 : 438-440.
- 27- LONGANGA A.O., VERCRUYUSSE A., FORIERS A., 2000. Journal of ethnopharmacology, 2000 : 411-423.
- 28- NAUCIELC., 2001. Bacteriologie médicale, ed. Paris, 2001 : 459 pages.
- 29- NULTSHW., 1998. Botanique générale, ed. Boeck université, 1998 : 318.
- 30- PREM P.Y., PRASOON G.A.K., CHATURVEDI P.K., 2005. Bioorganic and medicinal chemistry. March, 2005 : 1497-1505.

31- RICHTER G., 1993. *Metabolisme des végétaux*, ed. France, 1993 : 437-455.

32- SANDRO, GIACOMELLI, GRACIELA M., WELLEINGTON A., CLAUDIA M., 2004. *phytochemistry*, April 2004: 933-937.

34- SCAZZOCCHIO F., COMETA M.F., TOMASSINI L., PALMERY M., 2001. Antibacterial activity of *hydrastis canadensis* extract and its major isolated alkaloids, 2001:285-291.

33- SENER B., KOYUNCU M., BINGOLF, MUHTAR F., 1999. Production of bioactive alkaloids from Turkish geophytes, 1999:1-6.

35- SINGLETON P., 1999. *Bacteriologie*, ed. DUNOD, Paris, 1999: 239-241, 391.

36- SOHRAB M.H., CHOWDHURY, RAHMAN K.M., HASSAN C.M., RASHID M.A., 2004. *Fitoterapia*, July 2004:510-513.

37- SUTRA L., FEDERIGUI M., JOUVE J.L., 1998. *Manuel de bactériologie alimentaire*, ed. Polytechnica, 1998 : 308 pages.

38- TORTORA G.J., CASE B.L., MARTIN L., 2003. *Introduction à la microbiologie*, ed. Du nouveau pédagogique. Inc, 2003 : 338.

39- VERON M., DEMINOE L., 1982. *Bacteriologie médicale*, ed. Paris, 1982 : 529-533.

40- VICAN P., 2001. *La rousse encyclopedis des plantes medicinales*, ed. France, 2001 : 1259 pages.

41- YOHANDRA R., TORRES R.G., BERLINCK C.S., GISLENE G.F., 2002. *Toxicon*, July 2002 : 885-891.

42- الشحات نصر أبو زيد. النباتات و الأعشاب الطبية. 1986 : 733 .

43- الشيخ الرئيس أبو علي الحسين ابن علي ابن سينا. القانون في الطب. 2002 : 492-493

44- د. حلیمی عبدالقادر. النباتات الطبية في الجزائر. 2004 : 139-138 .

45- د. فوزي محمود سلامة مقدمة تصنيف النباتات و التوزيع. 1994 : 183-184 .

46- د. محمد السيد هيكل. د. عبد الله عبد الرزاق عمر. النباتات الطبية و العطرية. 1993 : 122-124 .

47- www.bacterio/Hyoscyamus/A.html.

Annexe

Les réactifs

1. Violet de gentiane (pour la coloration de Gram)

Violet de gentiane	1g
Alcool à 90°	10 ml
Phénol	2g
Eau distillée	100 ml

2. Lugol

Iode	1g
Iodure de potassium	2g
Eau distillée	100 ml

3. Fuschine de Ziehl

Fuschine basique	1g
Alcool éthylique à 90°	10 ml
Phénol	5g
Eau distillée	100 ml

Pour la coloration de Gram, cette solution doit être diluée au 15% ou bien le colorant doit être dilué sur la lame (1 goutte de colorant sur la lame recouverte d'eau)

4. Kavacs : réactif pour indole

Alcool amylique ou isoamylique	150 ml
P. Diméthylaminobenzaldehyde	10 g
Acide chlorhydrique concentré	50 ml

Ajouter l'acide en dernier et lentement. Conserver au réfrigérateur.

5. α Naphtol (réactif pour la réaction de vages-proskauer)

α Naphtol	6 g
Alcool éthylique à 60 %	100 ml

Conserver dans un flacon opaque au réfrigérateur

6. Rouge de méthyle

Rouge de méthyle	0.5 g
Alcool éthylique à 60 %	100 ml

7. Nitrate

Réactif 1

Acide acétique	285 ml
Eau distillées	715 ml

Acide sulfanilique	8 g
--------------------	-----

Réactif 2

Acide acétique	285 ml
Eau distillé	715 ml
N-N-diméthylamine	6 ml

Milieus de cultures

1. Gélose nutritive ordinaire

Peptone	10 g
Extrait de viande	5 g
Chlorure de sodium	5 g
Gélose	15 g
pH	7.2

Répartir en tubes à essais (6 à 7 ml).

. En autoclaver 20 mn à 120°C après autoclavage.

Solidifier les tubes en position inclinée.

2. gélose Hektoen

Protéose peptone	3 g
Extrait de levure	5 g
Chlorure de Sodium	5 g
Sels biliaires	9 g
Citrate de fer ammoniacale	1.5 g

Salicine	2 g
Lactose	12 g
Saccharose	12 g
Fuchsine acide	0.1 g
Bleu de bromothymol	0.065 g
Agar	13 g
pH	7.5

3. Muller Hinton. (Gélose pour antibiogramme)

Extrait de viande	2 g
Hydrolysate acide de caséine	17.5 g
Amidon	1.5 g
Gélose	10 g
pH	7.4
Autoclaver 15 mn à 115°C.	
Couleur en boîtes de Petri.	

4. mannitol- mobilité. (gélose ou milieu)

Peptone	20 g
Nitrate de potassium	1 g
Mannitol	2 g
Rouge de phénol à 1%	4 ml
Gélose	4 g
pH	8.1
Répartir en tubes à essais (8 à 10 ml).	
Autoclaver 15 mn à 120°C.	
Solidifier en culot.	

5. TSI (gélose ou milieu). Gélose, glucose, lactose, saccharose, H₂S

Peptone	20 g
Extrait de viande	3 g
Extrait de levure	3 g
Chlorure de sodium	5 g
Glucose	1 g
Lactose	10 g
Saccharose	10 g
Citrate de fer	0.5 g
Hyposulfite de sodium	0.5 g
Rouge de phénol	25 mg
Gélose	12 g

pH 7.4
Répartir en tubes à essais (8 à 10 ml).
Autoclaver 15 mn à 115°C.
Solidifier en position semi-incliner.

6. Simmons (milieu ou gélose au citrate)

Sulfate de magnésium 0.2 g
Phosphate mono ammoniacal 1 g
Phosphate dipotassique 1 g
Citrate de sodium 2 g
Chlorure de sodium 5 g
Bleu de bromothymol 80 mg
Gélose 12 g
pH 6.8
Répartir en tubes à essais (6 à 8 ml).
Autoclaver 20 mn à 120°C.
Solidifier en position inclinée ou semi inclinée.

7. Eau péptonée

Peptone exemple d'indole 15 g
Chlorure de sodium 5 g
pH 7.2
Répartir en tubes à essais (8 à 10 ml).
Autoclaver 15 mn à 120°C.

8. urée -indole.milieu de Fergusson

L-Tryptophane 3 g
Phosphate monopotassique 1 g
Phosphate bipotassique 1 g
Chlorure de sodium 5 g
Urée 20 g
Alcool à 95 % 10 ml
Rouge de phénol 25 mg
pH 6.7
Steriliser par filtration
Répartir en tubes à essais. (2 à 5 ml).

9. Clark et lubs

Peptone	10 g
Phosphate dipotassique	2 g
Glucose	5 g
pH	7

Répartir en tubes à essais (5 ml).
Autoclaver 20 mn à 120°C.

10. Nitrate de potassium (bouillon nutritif)

Bouillon nutritif	1 litre
Nitrate de potassium	1 g
pH	7

Répartir en tubes à essais (7 à 10 ml).
Autoclaver 15 mn à 120°C.

11. Moller (milieu de base pour étude des décarboxylases)

Peptone	5 g
Extrait pourpre de bromocrésol	5 g
Pourpre de bromocrésol	0.1
Rouge de crésol	5 mg
Pyridoxal	5 mg
Glucose	0.5 g
pH	6

Le test de decarboxylation de lysine (LDC) est réalisé en ajoutant à chaque tube de milieu 1 ml de lysine à 10 %. (Sterilisé par filtration) (Concentration finale 1%).

Les tests arginine dihydrolase (ADH) et ornithine decarboxylase. (ODC) sont réalisés de identique en utilisant des solutions à 10 % respectivement d'arginine et d'ornithine

Répartir en tubes à essais (9 à 10).
Autoclaver 15 mn à 120°C.

12. Bouillon nutritif. Nutrient broth

Peptone	10 g
Extrait de viande	5 g
Éventuellement NaCl 5 g	
pH	7.2

Répartir en tubes à essais (7 à 10 ml).
autoclaver 20 mn à 120°C.

13. Eau physiologique. Sérum physiologique

Chlorure de sodium

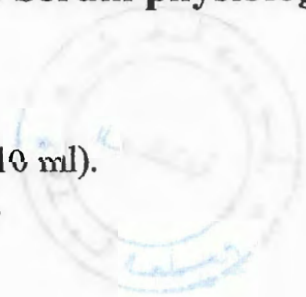
8.5 g

Eau distillée

1 litre

Répartir en tubes à essais (10 ml).

Autoclaver 20 mn à 120°C.



Présenté par: Hafsi Leila Bouchekhou Lamia Bousba Fatima	Date de soutenance : 2 / 09 / 2005
Thème : Etude del'activité antibactérinne des alcaloïdes extraits de la plante <i>H. albus</i>	
Résumé : Etant donné leur importance sur l'échelle thérapeutique, les extraits antibactériens des plantes forment un sujet très important pour la recherche scientifique. Le point de départ de cette étude est la revivification, la purification et l'indentification des souches de <i>Salmonella</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Streptococcus</i> et de <i>Staphylococcus</i> , suivies d'une extraction des alcaloïdes de la plante <i>H.albus</i> et à la fin la réalisation de test de sensibilité des souches étudiées à l'extrait d'alcaloïdes. L'étude de sensibilité des souches à l'extrait d'alcaloïdes montre une résistance totale des <i>Escherichia</i> , <i>Staphylococcus</i> et <i>Salmonella</i> , et une sensibilité variable pour les <i>Streptococcus</i> .	
Mots clés : <i>Escherichia</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Salmonella</i> , Alcaloïdes, <i>H.albus</i>	
Summary : Because of their importance on the therapeutic scale, the antibacterial extraction from the plants form a significant subject for scientific research. The starting point of this study is the reactivation, purification and the identification of the stocks: <i>Salmonella</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Streptococcus</i> and <i>Staphylococcus</i> followed by an extraction of the alkaloids of the plant <i>H.albus</i> and at the end, the conducting of tests of sensitiveness to the strains studied to the alkaloid extract. The study of sensitiveness to the stocks to the alkaloids extract shows a whole resistance to <i>Escherichia</i> , <i>Staphylococcus</i> and <i>Salmonella</i> , and a variable sensitiveness to the <i>Streptococcus</i> .	
Key words: <i>Escherichia</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Salmonella</i> , Alkaloids, <i>H.albus</i>	
<p style="text-align: center;">ملخص</p> نظرا لأهميتها العلاجية، تعد المستخلصات ضد بكتيرية للنباتات محورا هاما في البحوث العلمية. نقطة البداية في هذا البحث هي إعادة النشاط، التنقية و التعريف للسلاطات: <i>Salmonella</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Streptococcus</i> و <i>Staphylococcus</i> ثم قمنا باستخلاص قلويدات نبات <i>H.albus</i> و أخيرا إجراء اختبار حساسية هذه السلاطات تجاه مستخلص القلويدات. النتائج المتحصل عليها أظهرت مقاومة <i>Escherichia</i> , <i>Salmonella</i> و <i>Staphylococcus</i> و حساسية متغيرة بالنسبة ل <i>Streptococcus</i>	
الكلمات المفتاح : <i>Escherichia</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Salmonella</i> , القلويدات، <i>H.albus</i>	