

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	
ABREVIATIONS	
GLOSSAIRE	
LISTE DES TABLEAUX	
LISTE DES FIGURES	
INTRODUCTION	1
PARTIE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	
I.1. La Famille des ASTERACEAE	4
I.1.1. Généralités	4
I.1.2. Description botanique.....	4
I.1.3. <i>Crassocephalum rubens</i>	5
I.1.4. Ecologie et distribution.....	7
I.1.5. Ethnobotaniques et utilisation traditionnelles de <i>Crassocephalum rubens</i>	9
PARTIE II : MATÉRIELS ET MÉTHODES	
II.1. MATÉRIELS	10
II.1.1. Matériel végétal.....	10
II.1.2. Germes testés.....	10
II.1.3. Milieux de culture	11
II.1.4. Matériels de laboratoire.....	13
II.1.5. Disques pour le test antibiogramme et antibiotiques	13
II.1.6 La stérilisation	14
II.2. MÉTHODES	14
II.2.1. Enquête et récolte	14
II.2.2. Préparation de l'échantillon	14
II.2.3 Extraction	14
II.2.4 Criblage phytochimique	15
PARTIE III : RESULTATS ET DISCUSSION	
III.1. Enquête sur le terrain et identification de la plante.....	23
III.2. Caractéristiques de l'extrait de la plante	23
III.3. Nature chimique de l'extrait de la plante.....	24
III.4. ÉTUDE BIOLOGIQUE.....	25
III.4.1. Caractères culturels des souches microbiennes	25

III.4.2. Caractères biochimiques des souches microbiennes.....	26
III.5. Effets de l'extrait de <i>Crassocephalum rubens</i> sur la croissance des microorganismes..	27
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	31
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	32
ANNEXES	

ABREVIATIONS

AFNOR : Association Française de Normalisation

ASJA : Athénée Saint Joseph Antsirabe

°C : degré Celsius

h : heure

min : minute

ml : millilitre

mm : millimètre

pH : potentiel d'hydrogène

μl : microlitre

GLOSSAIRE

Akène : fruit sec indéhiscent dont les parois sont distinctes de l'unique graine qu'il renferme.

Albumen : tissus de réserves nutritives de la graine chez les angiospermes (plantes à fleurs).

Antibiogramme : examen bactériologique permettant d'apprécier la sensibilité d'une bactérie vis-à-vis de divers antibiotiques.

Antibiotique : substance naturelle ou synthétique qui détruit ou bloque la croissance des bactéries.

Broyat : produit réduit en très fins morceaux obtenu par choc ou pression.

Capitule : partie d'une plante formée de fleurs insérées les unes à côté des autres sur l'extrémité élargie en pédoncule, formant une seule fleur.

Carminative : faciliter l'expulsion des gaz intestinaux.

Condylome : sont des petites tumeurs cutanées qui se localisent au niveau des organes génitaux ou du pourtour de l'anus.

Corymbe : inflorescences groupées en pédoncules inégaux et fleurs sur le même plan.

Dermatose : désigne toutes les affections de la peau, et par extension, celles des ongles ou des cheveux.

Explant : fragment d'organe ou de tissu prélevé d'un organisme vivant et cultivé in vitro.

Extrait : produit obtenu après un procédé d'extraction chimique ou mécanique.

Filariose : maladie due à des nématodes parasites appelés filaires.

Huile essentielle : substance odorante et volatile secrétée naturellement par certaines plantes catégorisées comme plantes aromatiques, et contenue soit dans le calice, la tige, l'écorce ou toute autre partie de la plante.

Indéhiscent : ne s'ouvre pas spontanément à la maturité.

Inflorescence : est la disposition des fleurs sur la tige d'une plante à fleur.

Involucre : désigne une collerette d'écailles ou de bractées libre ou soudées ensemble à la base d'une inflorescence.

Laticifère : élément botanique contenant du latex.

Macération : mise en contact prolongée et à froid d'une substance dans un liquide dissolvant. Extraction par ce mode opératoire des substances pharmaceutiques contenues dans les plantes.

Méningite : inflammation des membranes qui enveloppent le cerveau et la moelle épinière généralement causée par une infection.

Oblanceolé : ce qui est en forme de fer de lance renversé voir aussi obovale.

Obovale : de forme ovale dont la partie supérieure est plus large que la partie inférieure.

Ostéomyélite : inflammation de l'os causée par une infection, généralement au niveau des jambes, des bras ou de la colonne vertébrale.

Panicule : grande inflorescence en grappes, ramifiée et lâche.

Pappus : petite touffe ou faisceau de poils ou de soies qui surmonte certains akènes.

Plante aromatique : plante qui contient suffisamment de molécules aromatiques dans ces organes producteurs : feuilles, fleurs, fruits, graines, écorce, racines.

Plante herbacée : désigne toute plante vivace, annuelle ou bisannuelle qui n'a pas de tige ligneuse persistante au dessus du sol ou dont l'aspect est de la nature de l'herbe verte par opposition à ce qui est ligneux.

Plante lianescente : est une plante grimpante herbacée ou ligneuse à la tige particulièrement souple.

Plante succulente : est une plante charnue adaptée pour survivre dans des milieux arides.

Verticille : groupe de plus de deux feuilles qui naissent au même niveau sur la tige en anneau.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Normes utilisées pour la lecture des résultats du test d'antibiogramme.....	22
Tableau 2 : Caractéristiques de l'extrait de la plante de <i>Crassocephalum rubens</i>	23
Tableau 3. Caractères cultureux des souches microbiennes	24
Tableau 4: Caractères biochimiques des souches	25
Tableau 5 : Criblage phytochimique de l'extrait aqueux à chaud	26
Tableau 6 : Diamètre du halo d'inhibition de la croissance des souches testées.....	27

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : <i>Crassocephalum rubens</i>	6
a) Fleur <i>Crassocephalum rubens</i>	6
b) Pied <i>Crassocephalum rubens</i>	6
Figure 2 : Répartition géographique de <i>Crassocephalum Rubens</i>	8
Figure 3 : Test d'antibiogramme sur <i>Staphylococcus aureus</i>	28

INTRODUCTION

Les plantes médicinales restent le premier réservoir de nouveaux médicaments. Elles sont considérées comme une source de matière première essentielle pour la découverte de nouvelles molécules nécessaires à la mise au point de futurs médicaments (Maurice.,1997).

L'action de la phytothérapie sur l'organisme dépend de la composition des plantes médicinales. Depuis le XVIII^{ème} siècle, les savants ont commencé à extraire et à isoler les substances chimiques qu'elles contiennent (ISERIN., 2001).

L'étude des plantes est toujours d'actualité malgré son ancienneté. Cela tient principalement au fait que le règne végétal représente une source importante d'une immense variété de molécules bioactives qui ont des intérêts multiples en industrie alimentaire, en cosmétologie et en pharmacie. Parmi ces composés on retrouve, les coumarines, les alcaloïdes, les acides phénoliques, les tanins, les terpènes et les flavonoïdes (BAHORUN et *al.*,1996). Elles sont douées de multiples vertus thérapeutiques et jouent un rôle très important, principalement, dans la lutte contre les cancers, les maladies cardiovasculaires, la diarrhée et certaines maladies consécutives au stress oxydatif ou d'origine infectieuse (ISERIN., 2001).

L'évaluation des propriétés antibactériennes demeure une tâche très intéressante et utile, en particulier pour les plantes d'une utilisation rare ou peu connue dans la médecine traditionnelle (DA SILVA., 2004).

Madagascar est mondialement connue pour la beauté exceptionnelle de sa faune et de sa flore, ainsi que l'abondance de ses plantes médicinales et aromatiques. Située dans l'Océan Indien, elle présente une nature extraordinairement variée. Selon les botanistes du Parc botanique et zoologique de Tsimbazaza, la flore malgache présente 14 000 espèces dont plus de 80% sont endémiques. L'Ile Rouge possède l'une des flores les plus riches au monde (BOITEAU et *al.*,1997). A part sa biodiversité unique, les espèces introduites, ont des propriétés exceptionnelles par rapport aux activités de ces plantes dans leurs pays d'origine (BOST.,1961).

Plus de 350 essences de végétaux sont recensées dans le monde, environ 40 d'entre elles sont utilisées en aromathérapie. Leur usage est multiple, la forme la plus courante est l'utilisation par voie orale, sa pratique nécessite un avis médical. Les huiles peuvent aussi être prises par voie rectale ou encore sous forme de massage. Toutefois, toute utilisation des

huiles essentielles est à exécuter avec précaution puisque certains principes actifs peuvent provoquer des allergies ou encore des irritations (Web 1).

A Madagascar, certaines maladies sont traitées de façon traditionnelle, à l'aide de plantes. Dans l'Itasy, région des hautes terres de l'île, abritant 703252 habitants sur ses 8600 km² ; la population utilise le décocté de feuilles de *Crassocephalum rubens* (tranobemaye) pour guérir les maux de ventre et la diarrhée selon nos enquêtes auprès de certains tradipraticiens de la région. L'objectif de l'étude est de déterminer des propriétés antibactériennes ainsi que la détermination des fractions actives responsables de ces propriétés au sein de cette plante. Les plantes tiennent une place importante dans la médecine traditionnelle des Malgaches. Certaines plantes ont déjà fait leurs preuves dans la médecine traditionnelle et moderne malgache à savoir :

- ✓ *Cinnamosma fragans* ou Mandravasarotra(CANNELACEAE), un puissant antibactérien (Web 2).
- ✓ *Harungana madagascariensis* (HYPERICACEES) ou Harongana dont l'inhalation des vapeurs de la décoction d'écorce permet de traiter l'ictère. La décoction et l'infusion des feuilles sont respectivement indiquées pour le traitement de la constipation et des maux d'estomac.(Web 3).
- ✓ *Cedrelopsis grevei* ou Katrafay (LAURACEAE) dont l'huile essentielle de l'écorce est fébrifuge, vermifuge, cicatrisante, stomachique, antiparasitaire mais également anti-inflammatoire (RAKOTOMALALA., 2004).
- ✓ *Aloe vera* ou Vahona (ALOACEAE), ayant des vertus cicatrisantes, renforce les défenses immunitaires et agit sur tout l'appareil digestif. Elle est indiquée en prévention de certaines formes de tumeurs et de maladies de dégénérescence. Il s'agit d'un anti-inflammatoire naturel, d'un facteur de jeunesse et de longévité en prise quotidienne (Web 4).
- ✓ *Catharanthus roseus* ou Voanenina (APOCYNACEAE), une plante anticancéreuse. Par ailleurs, maintes espèces introduites en raison des conditions édapho-climatiques malgaches et de leurs propriétés spécifiques s'adaptent bien à Madagascar. Aussi, la flore malgache est tellement unique avec une biodiversité éminente (Web 5).

- ✓ *Psiadia nigrescens* (Agnandraisoa) dont les feuilles ou tiges sont utilisées dans le traitement de la « syphilis » (farasisa) et diverses dermatoses (JEAN-PIERRE NICOLAS., 2012).
- ✓ *Vernonia cinerea* (L.)Less (Tsiangadifady Tsiromanta) la plante entière ou les feuilles guérissent certaines pathologies cardiaques, les plaies, les coliques et la diarrhée (JEAN-PIERRE NICOLAS., 2012).

Dans ce contexte, cette étude a pour objectif d'évaluer la propriété antimicrobienne de la plante *Crassocephalum rubens* à des fins de valorisation.

La première partie de ce mémoire présente les généralités. La deuxième partie traite l'étude chimique de l'extrait de la plante. La troisième partie expose les travaux biologiques réalisés avec l'extrait de la plante. La conclusion générale et les perspectives constituent la dernière partie.

PARTIE I-
SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. La Famille des ASTERACEAE (HUMBERT, 1963)

I.1.1. Généralités

La famille des Asteraceae à laquelle appartient *Crassocephalum rubens*, est un grand groupe cosmopolite comportant 1 314 genres et 21 000 espèces. C'est la famille la plus importante, répandue dans le monde entier, mais principalement dans les régions tempérées. Elle comprend des plantes herbacées, lianescentes ou succulentes, et aussi des buissons à grands arbres hermaphrodites, monoïques ou rarement dioïques. Les feuilles sont alternées simples, entières ou parfois spinescentes ressemblant à des écailles.

Les inflorescences axillaires ou terminales sont en capitules et portent de petites à grandes fleurs régulières ou irrégulières, sous-tendues par un involucre de bractées disposées sur un seul ou plusieurs verticilles. Les capitules sont solitaires ou ramifiés de type corymbiforme ou paniculés, munis ou non de bractées. Les inflorescences sont composées soit d'un type, soit de deux types de fleurs, avec des fleurs centrales bisexuées et des fleurs périphériques femelles par avortement des étamines. Le fruit est un petit akène sec indéhiscent couronné ou non par le pappus soyeux ou sétacé, ou parfois par la base durcie de la corolle. L'albumen est absent.

I.1.2. Description botanique

- L'appareil végétatif

Les Astéracées sont principalement des plantes herbacées vivaces, à feuilles alternées. Cependant toutes les formes végétales s'y trouvent : herbes vivaces, herbes annuelles, arbustes, lianes, voir Astéracées cactiformes.

Les Astéracées sont pourvus d'un appareil sécréteur ordinairement bien développé :

- cellules et canaux sécréteurs à essence, poils sécréteurs. Certaines espèces sont ainsi très aromatiques et utilisées comme telles (Camomille, Armoise...)
- laticifère comme le groupe des Chicorées et plantes affines (Pissenlit, Laiterons...). Lorsque la tige de ces plantes est brisée, il s'écoule un suc blanchâtre.

- L'appareil reproducteur

Les Astéracées sont caractérisées par :

- l'inflorescence en capitule,
- les fleurs, très particulières dont les anthères sont soudées entre elles.
- le fruit : un akène généralement surnommé pappus.

Les fleurs sont composées de :

- 5 sépales, souvent à peine visibles. Le calice est représenté par un simple bourrelet annulaire, des écailles ou des soies.
- 5 pétales formant soit une corolle régulière en tube (tubulée), soit une corolle irrégulière ligulée (c'est-à-dire à une lèvre).
- 5 étamines à l'anthère soudée d'une part à la corolle (par la base de leur filet), d'autre part entre elles par leurs anthères qui forment un manchon autour du style.
- 2 carpelles soudés, formant un ovaire à une loge. Le style se termine par 2 stigmates, qui portent une brasse de poils généralement sur leur sommet, parfois à la base.

I.1.3. *Crassocephalum rubens*

- Position systématique

Il s'agit d'une espèce de la famille des Astéracées.

La position systématique de *Crassocephalum rubens* est la suivante :

Règne	: Végétal
Sous classe	: Asteridae
Ordre	: Asterales
Famille	: Asteraceae
Genre	: <i>Crassocephalum</i>
Espèce	: <i>rubens</i>

Nom vernaculaire : Tranobemay(Madagascar)

Statut : Plante introduite

▪ Description botanique

✓ Appareil végétatif

Crassocephalum rubens est une plante herbacée annuelle, érigée atteignant 80 cm de hauteur. Les feuilles sont disposées en spirale, sessiles ; stipules absentes. Le limbe des feuilles inférieures est elliptique, oblanceolé ou obovale, de 4,5-16 cm x 2-5 cm, soit non lobé, soit 2-4 lobé ou rarement pennatilobé. Le limbe des feuilles supérieurs est étroitement lancéolé, elliptique ou ovale, non lobé ou 6-8 lobé. (LEMMENS., 2003).

✓ Appareil reproducteur

L'inflorescence se caractérise par 18 capitules au maximum disposés en corymbe terminal. Les fleurs sont bisexuées, égales, corolle tubulaire de 8 à 10 mm de long, les fleurs présentent une coloration bleu violet pâle, mauve ou violette. Les fruits sont des akènes côtelés, atteignant 2,5 mm de long, surmonté d'un pappus de poils blancs de 8 à 12 mm de long. La figure1 montre les photos d'un pied et de fleurs de *Crassocephalum rubens*.



Figure 1 : *Crassocephalum rubens* : Fleurs et Pieds

SOURCE: (West African plants)

I.1.4. Ecologie et distribution

La plante *Crassocephalum rubens* se trouve dans toute l'Afrique tropicale y compris les îles de l'Océan Indien dont Madagascar, où elle a probablement été introduite. Elle comprend environ 24 espèces, parmi lesquelles de nombreuses espèces ont des usages médicaux (LEMMENS., 2003).

Elle se présente comme adventice dans les champs, au bord des rivières et aux abords des routes, la plupart du temps à des altitudes élevées. Elle est commune dans les zones humides et subhumides de Madagascar, du niveau de la mer jusqu'à 1400 m d'altitude. Cette plante est aussi rencontrée dans d'autres provinces de Madagascar : Antsiranana, Fianarantsoa, Mahajanga, Toamasina et Toliara. Mais elle se présente en minorité dans ses régions la.

Elle se développe dans les cultures sur les pentes, dans les vallées ou dans les plaines, sur les talus, les bords des champs, les bois, les cours d'eau et les chemins. La localisation de la plante étudiée est représentée sur la figure 2.



Figure 2 : Répartition géographique de *Crassocephalum Rubens* à Madagascar

SOURCE: (JENMAN MADAGASCAR SAFARIS)

I.1.5. Ethnobotaniques et utilisation traditionnelles de *Crassocephalum rubens*

Les tradipraticiens utilisent *Crassocephalum rubens* de façon ancestrale pour le traitement des maladies diarrhéiques. Les feuilles sont préparées en décoction à une température très élevée, le malade le boit régulièrement pendant une période de quatre à cinq jours. Ils se servent également des feuilles de la plante pour traiter des plaies. Les feuilles sont pilées puis déposées délicatement sur la plaie.

Les feuilles de *Crassocephalum Rubens* sont couramment consommées dans le sud-ouest du Nigeria, un peu moins dans d'autres zones humides d'Afrique de l'Ouest et d'Afrique centrale. Elles sont mucilagineuses et utilisées pour la préparation de potages et de sauces. En Ouganda, les feuilles sont séchées, hachées puis cuites avec des pois ou des haricots. Au Malawi, les feuilles et les jeunes pousses sont cuites avec de l'arachide et des tomates (LEMMENS., 2003).

La plante est aussi utilisée pour traiter les problèmes de foie et les rhumes, et à usage externe pour traiter les brûlures, les douleurs oculaires (filariose), le mal d'oreille, la lèpre et le cancer du sein. En Afrique de l'Est, elle est utilisée comme antidote contre toute forme d'empoisonnement (LEMMENS., 2003).

PARTIE II:
MATERIELS ET METHODES

II.1.MATERIELS

II.1.1. Matériel végétal

Il s'agit de la plante médicinale *Crassocephalum rubens* récoltée dans la région d'Itasy : latitude -18°54'2,443 et longitude 46°58'49,837, au mois de mars 2016.

Crassocephalum rubens se développe dans un climat tropical humide. La plante récoltée est conservée au congélateur à l'abri de la lumière, de l'air, de la chaleur et de toutes autres contaminations pour éviter la dégradation en attendant l'extraction.

II.1.2. Germes testés

Le support microbien utilisé lors de cette étude est constitué de quatre(4) souches bactériennes dont deux sont des souches de références conservées *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* et deux souches isolées et identifiées par le laboratoire de Microbiologie de l'Université d'Athénée Saint Joseph Antsirabe (ASJA) : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*. Ces microorganismes causent plusieurs pathologies chez l'homme

A. *Bacillus cereus*

Bacillus cereus est une bactérie sporulée, aéro-anaérobie facultative et thermorésistante, à Gram +, mobile, les températures de croissance de cette bactérie peuvent varier de 5 à 50 °C.

Bacillus cereus peut produire deux types de toxines, une toxine émétique préformée dans les aliments et des toxines diarrhéiques produites pendant la croissance dans l'intestin grêle après ingestion de cellules végétatives ou de spores en quantité suffisante.

B. *Escherichia coli*

Escherichia coli est un bacille à Gram négatif (PATRICK et al., 1988), de forme non sporulée, de type anaérobie facultative, généralement mobile grâce aux flagelles, sa longueur varie de 2 à 6 µm, alors que sa largeur est de 1,1 à 1,5 µm (STEVEN et al., 2004). Les bactéries appartenant à l'espèce *E.Coli* constituent la majeure partie de la flore microbienne aérobie du tube digestif de l'homme et de nombreux animaux. Certaines souches sont virulentes, capables de déclencher spécifiquement chez l'homme ou chez certaines espèces animales des infections spontanées des voies digestives ou urinaires ou bien encore

des méningites néo-natales. D'autres souches appartenant à la flore commensale peuvent être responsables d'infections opportunistes variées, surtout chez les sujets aux défenses immunitaires affaiblies (PATRICK et al.,1988).

C. *Pseudomonas aeruginosa*

Le genre *Pseudomonas* de la famille *Pseudomonadaceae* comprend une soixantaine d'espèces : bacilles à Gram négatif(-), aérobies stricts, capables de se multiplier sur milieux usuels, mobiles par ciliature polaire. Les *Pseudomonas* sont des bactéries ubiquitaires, de nombreuses souches peuvent se développer à des températures allant jusqu'à 4°C.

D. *Staphylococcus aureus*

Les espèces *Staphylococcus aureus* sont des cocci à Gram positif, de forme sphérique, avec un diamètre de 0.8 à 1 µm et aérobies facultatifs. Elles sont regroupées en diplocoques ou en petits amas (grappe de raisin). Ce type de bactéries sont immobiles, asporulés, habituellement sans capsule. De nombreuses souches de *Staphylococcus aureus* produisent un pigment jaune doré (Patrick et al.1988). La présence de *S.aureus* dans l'organisme de l'homme peut donner la méningite, l'ostéomyélite et la diarrhée (STEVEN et al., 2004).

Les bactéries utilisées sont conservées sur gélose pente, au réfrigérateur à 4°C, jusqu'au moment de leur utilisation.

II.1.3. Milieux de culture

Comme tout être vivant les microorganismes ont besoin d'apport nutritionnel pour se développer. Les sources de carbone et d'azote, divers éléments minéraux, les facteurs de croissance, des substances inhibitrices et de l'eau sont apportés par les milieux de cultures tout en respectant les facteurs physico-chimiques (pH, température).

Les milieux utilisés lors de cette étude peuvent être classés en deux groupes : les milieux sélectifs et les milieux électifs.

A. Milieux sélectifs

La composition des milieux sélectifs est ajustée et adaptée de façon à ce qu'une population microbienne particulière puisse bien s'y développer (LARPENT., 1970, SINOT., 1985 ; TALLY., 1999).

- Milieu HEKTOEN ENTERIC AGAR : milieu sélectif pour *Escherichia coli*
- Milieu SLANETZ : milieu solide sélectif pour *Staphylococcus aureus*
- Milieu MOSSEL : milieu solide sélectif pour *Bacillus cereus*
- Milieu KING A et KING B : milieu solide sélectif pour le genre *Pseudomonas*

B. Milieux électifs

Les milieux électifs sont liquides ou solides, synthétiques ou non permettant la croissance d'un grand nombre de microorganismes (LARPENT., 1970 et 1997).

La composition des milieux utilisés est rapportée en annexe 3.

II.1.4. Matériels de laboratoire

Les matériels utilisés pour l'étude microbiologique sont standards et conformes à la norme NF V 08-002 :1996 relatifs aux règles générales pour les examens microbiologiques (AFNOR., 1996). Ces matériels sont divisés en 3 groupes : les verreries (pipettes graduées, erlenmeyer, bécher, fioles...), les petits matériels (balance de précision etc....) et les gros matériels (Etuve, four Pasteur, minéralisateur, ...).

II.1.5. Disques pour le test d'antibiogramme et antibiotiques

Ce sont des disques stériles non imprégnés et autoclavables de 6mm de diamètre produits par BIORAD.

Les antibiotiques sont des molécules possédant la propriété de tuer (bactéricide) ou de limiter la propagation (bactériostatique) des bactéries. Les antibiotiques sont utilisés en médecine pour lutter contre des infections bactériennes et doivent être choisis en fonction de leur efficacité sur la bactérie à combattre, ce qui peut être testé grâce à un antibiogramme. (ELGHOZI et DUVAL., 1992).

Il existe plusieurs classifications des antibiotiques, elles sont basées sur le spectre d'action, la cible, ou la famille chimique. Cette dernière est la plus fréquemment rencontrée. Les principales familles chimiques des antibiotiques sont : beta lactamines, pénicilline et céphalosporines, aminosides: streptomycine, gentamycine; Chloramphénicol et thiamphénicol; Cyclines: tétracyclines, doxycycline. Macrolides et apparentés : érythromycine, oléandomycine (COHEN et JACQUOT., 2001).

Les antibiotiques sont utilisés afin d'avoir une unité de comparaison par rapport à l'extrait de plante. Nous avons utilisé 4 antibiotiques pour servir de référence quant à la sensibilité de nos germe-tests :

- Ampicilline
- Amoxicilline acide clavulanique
- Doxycycline
- Oxacilline

II.1.6 LA STERILISATION

La stérilisation des milieux de culture, des disques pour antibiogramme et antifongogramme ainsi que des cônes des micropipettes est effectuée à l'autoclave vertical SYSTEC à 121°C sous une pression de 2 bars pendant 20 min. Les verreries et les pinces sont stérilisées à l'étuve MEMMERT à 180 °C pendant 30min.

II.2. METHODES

II.2.1. Enquête et récolte

Une enquête a été menée auprès de Rakoto Arson dans la région d'Itasy afin de recueillir des renseignements sur l'utilisation empirique dans le secteur thérapeutique de la plante de *Crassocephalum rubens*.

En même temps l'échantillon de la plante de *Crassocephalum rubens* a été prélevé et mis dans un sac stérile ensuite ramené rapidement au laboratoire d'Antsirabe. Une partie de la plante récoltée à Itasy a été identifiée au Laboratoire de Botanique du Parc Botanique et Zoologique de Tsimbazaza.

Une partie de l'échantillon a été ensuite conservée au congélateur de l'ASJA jusqu'à son utilisation.

II.2.2. Préparation de l'échantillon

Après identification, l'échantillon de la plante *Crassocephalum rubens* a été découpé en petits morceaux de 2cm. L'enquête sur le terrain a montré que le décocté des feuilles de la plante est utilisé en médecine traditionnelle pour le traitement des maladies diarrhéiques, la méthode d'extraction aqueuse à chaud est appliquée.

II.2.3 Extraction

L'extraction est une opération qui consiste à séparer certains composés d'un organisme actif selon diverses techniques. Le but est d'isoler une ou plusieurs molécules à partir d'un organisme.

10 g de matériel végétal sont broyés puis mis en suspension dans 80 ml d'eau distillée selon un rapport 1/ 8 (p/v). Le mélange ainsi obtenu est chauffé à reflux sous agitation magnétique

à 60°C pendant 2h, puis laissé en macération pendant une nuit au réfrigérateur à 4°C. Une agitation du macérât pendant 30min à la température ambiante suivie d'une filtration à l'aide d'un papier filtre est effectuée. Le filtrat obtenu est centrifugé à pendant 30 min. Le surnageant est concentré comme précédemment et le culot est éliminé. Le surnageant issu de la deuxième centrifugation constitue l'extrait brut

II.2.4 Criblage phytochimique

Le criblage phytochimique est la première étape de l'étude chimique d'une plante. Il est effectué afin d'inventorier les métabolites secondaires qui sont des molécules organiques complexes synthétisées et accumulées en petites quantités par les plantes, et qui sont repartis en diverses familles de substances naturelles comme par exemple les alcaloïdes, flavonoïdes et leucoanthocyanes, tanins et polyphénols, triterpènes, quinones et stérols insaturés, cardénolides et bufadénolides, hétérosides cyanogénétiques, anthraquinones et stérols insaturés.

Le criblage phytochimique ne renseigne pas sur la structure d'une molécule bien déterminée.

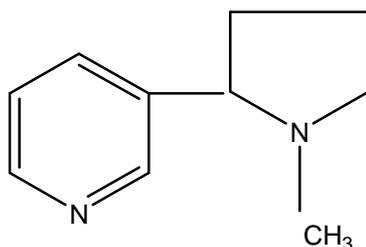
La mise en évidence de ces composés fait intervenir des réactions chimiques soit de précipitation, de coloration ou les deux.

A. LES ALCALOÏDES (LUCKNER.,1984)

Ce sont des substances organiques azotées d'origine végétale. Ils sont des dérivés d'acides aminés, essentiellement de la tyrosine et de l'ornithine. Cette grande famille est formée par 6000 composés environ. Leur classification se fait soit :

- Par leur distribution botanique (digitaline trouvé dans le g. *Digitalis*).
- Par leur structure : hétérocyclique ou non.
- Par la nature de l'acide aminé précurseur.

Ils peuvent être utilisés comme antalgique, anti-paludéen, ou poison. La nicotine est un exemple d'alcaloïde.

Formule de la nicotine :

La détection des alcaloïdes dans les extraits se déroule en trois étapes :

✓ Macération chlorhydrique

Le résidu d'évaporation à sec est macéré dans 3ml d'acide chlorhydrique 2N pendant 30min. Le mélange est filtré sur papier filtre, et le filtrat est divisé en 4 aliquotes dans 4 tubes à essai dont un sert de témoin et les 3 autres pour les tests préliminaires relatifs à ceux de MAYER, de WAGNER, et de DRAGENDORFF.

✓ Déroulement des tests

3 gouttes de chaque réactif sont ajoutées dans chacun des 3 tubes. L'apparition d'un précipité ou d'une floculation démontre la présence d'alcaloïdes dans l'extrait à analyser.

La composition des réactifs utilisés est donnée dans *l'annexe 2*.

✓ Test de confirmation

La réalisation des tests de confirmation est indispensable si les résultats des tests préliminaires sont positifs.

Le résidu d'évaporation à sec est repris dans 3ml d'acide chlorhydrique 5%. La solution obtenue est agitée dans un bain-marie bouillant pendant 15min. Le milieu est alcalinisé par l'ammoniaque après refroidissement, puis la solution est extraite 3 fois par du chloroforme. Les solutions chloroformiques recueillies sont rassemblées, ensuite évaporées à sec. La phase aqueuse alcaline est acidifiée par l'acide chlorhydrique 2N. Le mélange obtenu est filtré et le filtrat est réparti dans 4 tubes à essai dont un sert un témoin. Les 3 tubes sont testés respectivement par les réactifs de MAYER, de WAGNER, et de DRAGENDORFF. La

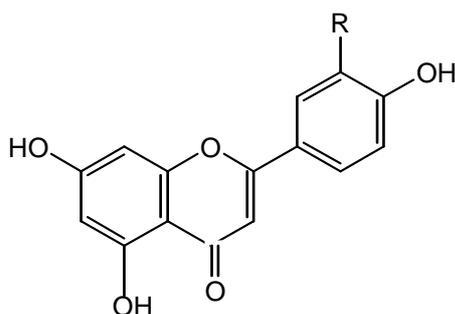
présence d'alcaloïdes dans l'extrait ou la fraction à tester est confirmée par la formation d'un précipité blanc soluble dans l'éthanol.

B. LES FLAVONOÏDES ET LES LEUCOANTHOCYANES (FLORKIN ET STOTZ.,1960)

Ce sont des composés phénoliques responsables de la coloration de nombreuses fleurs et de certains fruits. Ils possèdent 15 atomes de carbone formant 2 noyaux benzéniques unis par un chaînon de 3 carbones. Ils se divisent en 10 grands groupes : les catéchols, les leucoanthocyanidines, les dihydrochalcones, les chalcones, les anthocyanidines, les flavanones, les flavononols, les aurones, les flavones, et les flavonols.

Ils sont utilisés comme antispasmodique, diurétique, veinotonique.

Formule d'un flavone (exemple de flavonoïde) :



Le résidu d'évaporation à sec est repris dans 3ml d'éthanol puis filtré sur papier filtre. Le filtrat obtenu est réparti dans 4 tubes à essai dont un sert de témoin.

Les flavonoïdes : test à la cyanidine

0,5ml d'acide chlorhydrique 6N et 2 morceaux de tournure de magnésium sont ajoutés dans le premier tube.

Dans le deuxième tube, outre les composants précédents, 1ml d'eau distillée et 1ml d'alcool isoamylique sont versés.

La présence de flavonoïdes est indiquée par les virages de la coloration de la phase supérieure :

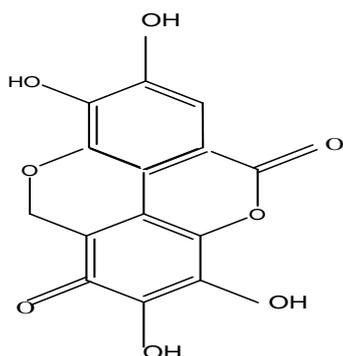
- De l'orange au rouge pour les flavones : cas du premier tube ;
- De l'orange au pourpre pour les flavonols : cas du premier tube ;

- De l'orange au rouge violacé pour les flavonones : cas du deuxième tube.

C. LES TANINS ET LES POLYPHENOLS (FLORKIN ET STOTZ.,1960)

Les polyphénols sont des molécules élaborées par des végétaux et certains microorganismes essentiellement les champignons. Ils sont caractérisés par la présence d'au moins un noyau benzénique lié à au moins un groupement hydroxyle libre ou engagé à une autre fonction.

Les tanins sont des substances d'origine végétale de structure polyphénolique. Leur poids moléculaire se situe entre 500 à 3000. Ils ont la propriété de rendre la peau imputrescible, de précipiter les alcaloïdes, la gélatine, et d'autres protéines. Dans le règne végétal, on peut trouver deux types de tanins : les tanins hydrolysables, et les tanins condensés ou proanthocyanidols. Ils sont utilisés comme protecteurs veineux, anti-diarrhéique, astringent. Les tanins éllagiques font partis des tanins hydrolysables. Voici sa formule :



Le résidu est dissous dans 2ml d'eau distillée. La solution ainsi obtenue est répartie en 4 parties égales dans 4 tubes à essai. Le premier tube est utilisé comme témoin, et les 3 autres servent à détecter et à identifier les tanins et les composés polyphénoliques.

Test à la gélatine

4 gouttes de gélatine aqueuse à 1% sont ajoutées dans le deuxième tube. La présence de tanins condensés de type catéchiue est marquée par l'apparition d'un précipité blanc, suivie d'un virage de coloration.

Test à la gélatine salée

Pour le troisième tube, 4 gouttes de gélatine salée (gélatine 1% dans une solution de chlorure de sodium) sont ajoutées. La présence de tanins hydrolysables de type pyrogallique est révélée par la formation d'un précipité.

Test au chlorure ferrique

4 gouttes de chlorure ferrique en solution méthanolique sont ajoutées dans le quatrième tube. La présence de tanins se traduit par un précipité et un changement de couleur :

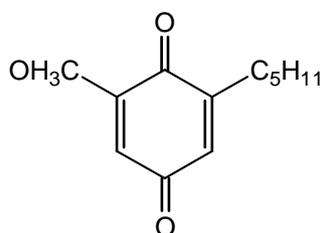
- Le virage au bleu-vert ou vert-noir indique la présence de tanins condensés de type catéchique.
- Le virage au bleu- noir signifie qu'il s'agit de tanins hydrolysables de type pyrogallique.

Si le test au chlorure ferrique donne une coloration bleu-noir ou vert-noir, alors que le test à la gélatine salée est négatif, on est en présence de composés polyphénoliques autre que les tanins.

D. LES QUINONES (LUCKNER.,1984)

Ce sont des composés oxygénés correspondant à l'oxydation de composés aromatiques. Ils sont caractérisés par un motif dicéto : Ils peuvent être ortho ou para-quinones. Les quinones naturelles appartiennent à trois groupes principaux : benzoquinones, naphtoquinones et anthraquinones.

Exemple d'une quinone: la primine (p-quinone)



La présence d'une coloration rouge lors de l'ajout de la soude 0,1 N à la macération alcoolique montre la présence de quinones. Cette réaction n'est pas spécifique car d'autres substances comme les auronnes donnent des résultats semblables.

E. LES SAPONINES : Indice de mousse (LUCKNER.,1984)

Ce sont des hétérosides à génine stéroïdique ou tritérpénique caractérisés principalement par leurs propriétés tensioactives. La partie osidique peut être soit le glucose, le fructose, ou le rhamnose. Les propriétés détergentes des plantes à saponosides ont été exploitées précocement par l'homme sur tous les continents. Les sapogénines stéroïdiques et tritérpéniques sont spécifiques pour quelques groupes du règne végétal.

Le résidu sec est dissous dans 1ml d'eau distillée. Le tout est versé dans un tube à essai de 1cm de diamètre. La persistance d'une mousse alvéolée de 3cm de hauteur pendant 30min après une agitation rigoureuse de 30s indique la présence de saponine dans l'extrait ou la fraction.

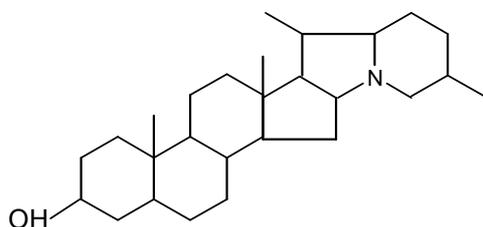
F. LES STEROIDES, LES TRITERPENES (NOHARA.,1989)

Le résidu sec de l'extrait est mis en suspension dans 3ml de chloroforme. Après agitation suivie d'une filtration sur papier filtre, la solution chloroformique est répartie dans 3 tubes à essai dont le premier sert de témoin, et les deux autres sont utilisés pour les tests.

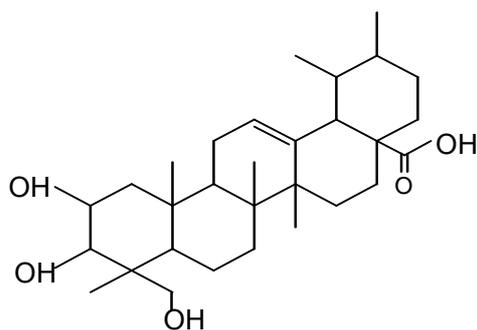
Les stéroïdes et triterpènes : test de LIEBERMANN BÜRCHARD

Les stéroïdes sont des composés à 27 atomes de carbone issus de la perte de 3 méthyles (au minimum) des triterpènes tétracycliques. Ils possèdent un noyau de base appelé spirostane. Ils sont utilisés comme anti-inflammatoire, anabolisants, contraceptifs. Seules, les bactéries peuvent se développer sans les stéroïdes.

Exemple de stéroïde :



Les triterpènes sont des composés à 30 atomes de carbone issus de la cyclisation du squalène. Ils ont toujours une structure polycyclique, habituellement tétra- ou penta- et sont presque toujours hydroxylés en 3. Le noyau de base peut être soit l'oléanane, soit l'ursane, soit le dammarane.

Exemple de triterpène :

2 gouttes d'anhydride acétique sont ajoutées dans le deuxième tube. Après une légère agitation, 4 gouttes d'acide sulfurique (H_2SO_4) concentré sont versées le long de la paroi. Le changement de coloration est observé après une heure. La formation d'un anneau rouge, violet ou mauve à l'interface est caractéristique des triterpènes, tandis que la coloration verdâtre de la phase supérieure caractérise celle des stéroïdes. Ces deux phénomènes peuvent être visualisés simultanément.

II.2.5. Test de l'activité antibactérienne de l'extrait de la plante : LE TEST D'ANTIBIOGRAMME

L'appréciation de la sensibilité des espèces bactériennes aux agents anti-microbiens est faite selon la méthode de diffusion sur gélose ou la méthode des disques.

Ce test détermine les caractères de sensibilité ou de résistance d'un germe aux agents anti-microbiens à l'exception des huiles essentielles.

A. Principe

L'antibiotique, déposé sur le disque à la surface d'une gélose uniformément ensemencée avec le germe à étudier, diffuse dans le milieu en créant une zone circulaire. Dans cette zone, la concentration de l'antibiotique décroît du centre vers la périphérie.

L'activité anti-microbienne est caractérisée par l'apparition d'un halo d'inhibition autour du disque imprégné d'antibiotique. Le diamètre de ce halo est fonction du degré de sensibilité du germe à l'antibiotique

B. Mode opératoire :

Le test se déroule en 3 jours successifs :

✓ **Premier jour :**

Chaque souche pure est ensemencée sur bouillon nutritif, puis incubée à 37°C pendant 24 h ; c'est le relancement de la culture des souches.

✓ **Deuxième jour :**

Chaque souche préalablement relancée est diluée de façon à avoir une concentration bactérienne égale à 10^3 cellules/ml : cette préparation constitue l'inoculum. 1ml de cet inoculum est ensuite ensemencé uniformément selon la technique d'inondation dans une boîte de Pétri contenant le milieu MUELLER HINTON de 4mm d'épaisseur. La boîte est laissée à la température ambiante pendant 1min afin que les germes puissent bien adhérer à la surface de la gélose. La boîte est séchée à l'étuve à 37°C pendant 15min. Les disques stériles pour antibiogramme (préalablement autoclavés) ont été imprégnés de 20µl d'extrait. Ils sont ensuite déposés à la surface du milieu ensemencé, à l'aide d'une pince fine. La préparation est incubée à 37°C pendant 24h. Chaque test est effectué en 2 exemplaires.

✓ **Troisième jour :**

Après incubation, le diamètre du halo d'inhibition formé autour de chaque disque est mesuré et leurs moyennes calculées.

Les normes utilisées dans l'expression des résultats des tests de diffusion sur gélose sont données dans le tableau 1. Il s'agit des normes données par le comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) en 1998, se basant sur les recommandations du Comité d'Experts de la Standardisation biologique de l'O.M.S en 1977.

Tableau 1 : Norme utilisée pour la lecture des résultats des tests d'antibiogramme

Diamètre du halo d'inhibition x	Degré de sensibilité du germe	Symbole
$x < 7$ mm	Insensible	-
$7 \text{ mm} \leq x < 8$ mm	Assez sensible	+
$8 \text{ mm} \leq x < 9$ mm	Sensible	++
$x \geq 9$ mm	Très sensible	+++

PARTIE III:
RESULTATS ET DISCUSSION

Les enquêtes sur le terrain ont été effectuées ainsi que l'identification de la plante *Crassocephalum rubens*.

III.1. Enquête sur le terrain et identification de la plante

D'après l'enquête ethnobotanique dans la région d'Itasy, *Crassocephalum rubens* ou « tranobemay » est une plante que la population locale utilise en médecine traditionnelle ; la décoction des feuilles permet de traiter les maladies diarrhéiques.

Cette plante a été identifiée par l'Herbarium du Parc Botanique et Zoologique de Tsimbazaza. L'identité de la plante a été confirmée en tant que *Crassocephalum rubens*.

III.2. Caractéristiques de l'extrait de la plante

Une extraction à chaud a été entreprise sur toute la plante. En effet, lors de l'enquête ethnobotanique effectuée, il s'avère que c'est la décoction qui est la plus conseillée. La méthode d'extraction aqueuse à chaud sur toute la plante a permis de recueillir l'extrait dont les caractéristiques englobant l'aspect, la couleur, le goût et l'odeur sont présentées dans le tableau 2.

Tableau 2 : Caractéristiques de l'extrait de la plante

Caractéristiques	Extrait
Aspect	Fluide, limpide
Couleur	Vert clair
Goût	Amer, piquant
Odeur	Pas piquante
Toucher	Huileux

L'extrait se présente comme un fluide limpide de couleur vert clair avec une odeur non piquante et présente un goût à la fois amer et piquant.

III.3. Nature chimique de l'extrait de la plante

Un criblage phytochimique a été effectué sur l'extrait brut obtenu à partir de *Crassocephalum rubens*, selon les méthodes décrites au paragraphe II-2-4 (p.16). Les résultats de ce criblage phytochimique sont résumés dans le tableau 3.

Tableau 3: Criblage phytochimique de l'extrait aqueux à chaud de *Crassocephalum rubens*

FAMILLES CHIMIQUES	TEST	Extrait
ALCALOIDES	MAYER	+
	WAGNER	+
	DRAGENDORFF	+
FLAVONOÏDES	Cyanidine	-
TANINS ET POLYPHENOLS	Gélatine	+
	Gélatine salée	-
	Chlorure ferrique	+
QUINONES	-	+
SAPONINES	Indice de mousse	+
STEROÏDES ET TRITERPENES	LIEBERMANN-BURCHARD	TRITERPENES : + STEROIDES : -

Ainsi, plusieurs métabolites secondaires ont été retrouvés dans l'extrait brut. Il réagit positivement aux réactifs généraux des alcaloïdes dans les tests de Mayer, de Wagner et de Dragendorff.

De la saponine, du triterpène, des tanins condensés de type catéchique, des quinones, et des polyphénols autres que tanins ont été également trouvés dans l'extrait brut.

Par contre, les flavonoïdes, les stéroïdes ainsi que les tanins hydrolysables sont absents dans l'extrait

III.4. ETUDE BIOLOGIQUE

Cette étude biologique consiste à déterminer l'activité antibactérienne de l'extrait de plante. Cependant, pour pouvoir mener à bien ce test, il faut être sûr de l'identité des souches bactériennes testées. Cette identification ou test de confirmation est axée sur la détermination des caractères cultureux sur milieu sélectif, ainsi que sur les caractères biochimiques des souches étudiées.

III.4.1. Caractères cultureux des souches microbiennes

Les caractères cultureux des germes tests sur milieux sélectifs sont donnés dans le tableau 3. D'après ces résultats, ces germes ont donné des colonies caractéristiques de leurs genre et espèces d'appartenance.

Tableau 4. Caractères cultureux des souches microbiennes

GERMES/CARACTERES	Couleur	Aspect de la surface	Milieux
<i>Bacillus cereus</i>	Blanche	rugueuse	Mossel
<i>Escherichia coli</i>	Noir verdâtre	lisse	Eosine Methylen Blue
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bleu-vert	lisse	King B
<i>Staphylococcus aureus</i>	Noire	lisse	Baird Parker

Les souches microbiennes ont produit des colonies caractéristiques sur leurs milieux sélectifs respectifs.

III.4.2. Caractères biochimiques des souches microbiennes

Les résultats de l'étude des caractères biochimiques des germes tests sont donnés dans le tableau 5. Les résultats de ces tests confirment l'identité des souches étudiées.

Tableau 5: Caractères biochimiques des souches

	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Gluc	+	+	-	+
Lact	+	+	+	+
Mob	+	+	+	+
Citr	-	-	+	-
Urée	-	-	+	+
H₂S	+	-	-	+

Gluc: Glucose Lact: lactose Mob: Mobilité

Citr: Citrate H₂S: Sulfure d'hydrogène

L'étude des caractères culturaux, biochimiques des souches microbiennes cibles pour le test d'activité antimicrobienne de l'extrait de *Crassocephalum rubens* a permis de constater qu'ils sont identiques à ceux des souches de référence contenus dans la matrice d'identification.

III.5. Effets de l'extrait de *Crassocephalum rubens* sur la croissance des microorganismes

Les résultats des tests d'antibiogramme effectués sur les 4 souches : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* sont donnés dans le tableau 6.

Tableau 6 : Diamètre du halo d'inhibition de la croissance des souches testées

Germes	Diamètre de l'extrait aqueux à chaud (mm)	Antibiotiques de références (mm)		interprétation
<i>Escherichia coli</i>	16	Ampicilline 10µg	22	Très sensible
		Amoxicilline/acide clavulanique 20 /10µg	20	
<i>Staphylococcus aureus</i>	15	Doxycycline 30µg	18	Très sensible
		Oxacilline 5µg	18	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10	Oxacilline 5µg	22	Très sensible
<i>Bacillus cereus</i>	13	Doxycycline 30µg	22	Très sensible

Pour bien élucider les travaux des tests d'antibiogrammes, la figure 3 montre les halos d'inhibitions comment ils se forment autour des disques.

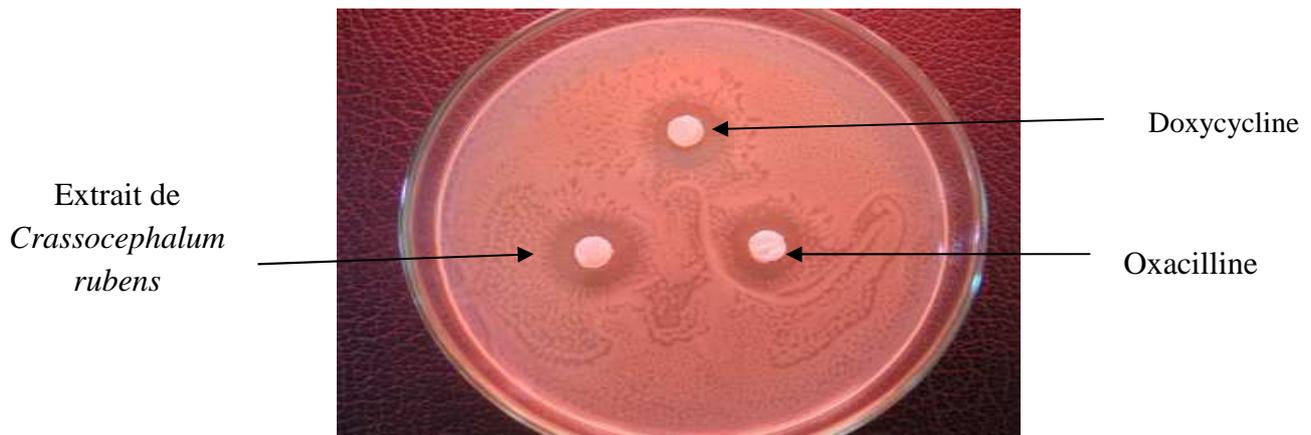


Figure 3 : Test d'antibiogramme sur *Staphylococcus aureus*

Les résultats des tests antimicrobiens de l'extrait de *Crassocephalum rubens* et des antibiotiques de référence sont consignés dans le tableau 6. Les diamètres des zones d'inhibition pour les germes testés varient entre 10 et 16mm. L'extrait aqueux et à chaud de *Crassocephalum rubens* est actif sur la croissance de souches bactériennes testées : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* et *Pseudomonas aeruginosa*. Pour les antibiotiques de références testés les diamètres des zones d'inhibition varient de 18mm à 22mm.

Ces résultats confirment également que les souches bactériennes ne sont pas des souches résistantes, ni multi résistantes vis-à-vis de ces antibiotiques de référence.

Vis-à-vis de l'extrait brut, le diamètre du halo d'inhibition de la souche d'*Escherichia coli* est le plus élevé avec 16mm puis *Staphylococcus aureus* avec 15mm, *Bacillus cereus* 13mm et enfin *Pseudomonas aeruginosa* 10mm. Ces résultats montrent que ces germes sont très sensibles aux molécules actives de *Crassocephalum rubens*. L'extrait présente aussi un large spectre vis-à-vis des bactéries, car elles sont à la fois très actives sur divers groupes des bactéries tels que les bactéries à Gram positif : *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* et des bactéries à Gram négatif : *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*. L'extrait de la plante est très sensible par rapport aux antibiotiques.

Par ailleurs d'autres auteurs ont donné des résultats qui sont similaires quant à la sensibilité des extraits de la plante de la famille des Astéracées face aux souches, les travaux réalisés sur l'espèce codée THL du genre *Ageratum* (Asteraceae) par TSIRININDRAVO en 2004 ont donné différents diamètres selon les parties de l'espèce codée THL du genre

Ageratum (tige, feuille, fleur, racine et partie aérienne) ainsi que le type de l'extrait. Parmi les souches utilisées : *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ainsi que *Salmonella sp.* Sur la tige, l'extrait aqueux à froid, à chaud et éthanolique absolu à chaud le plus grand diamètre (8mm) sur *E.coli* et (6mm) sur les autres souches. Pour les feuilles, l'extrait aqueux à froid possède un diamètre élevé sur *E.coli* (11,5mm) et 8mm sur *S.aureus* ; mais c'est surtout sur l'extrait aqueux à froid des fleurs qu'une grande activité est enregistrée sur toute la plante de l'espèce codée THL du genre *Ageratum* : *Staphylococcus aureus* (14mm) ; *Escherichia coli* (13mm) et 12mm pour *Salmonella sp.* Une autre étude sur *Artemisia campestris L.* (Asteraceae) de Boudjouref, 2011 montre que tous les extraits : extrait chloroformique, de l'acétate d'éthyle et l'extrait de l'éthanol ont réagi positivement au moins sur une des souches testées. La souche de *Pseudomonas aeruginosa* se révèle la plus résistante pour tous les extraits (30 mm). La souche de *Staphylococcus aureus* (24 mm) est plus résistante que les souches d'*E.Coli* (16 mm) ce qui confirme que la plante d'*Artemisia campestris* est douée de propriétés antimicrobiennes.

Les recherches de RAZANAPANALA (2008) sur *Helichrysum gymnocephalum* montrent que les extraits aqueux à froid, hydroalcoolique 75% à froid et 75% à chaud ne sont plus actifs vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* et de *Pseudomonas aeruginosa* que vis-à-vis d'*Escherichia coli*. En effet, nombreux sont les diamètres qui ne dépassent pas les 7mm, seul l'extrait aqueux à chaud présente des diamètres au-dessus de 7mm avec *E.coli* (7mm) ; *S.aureus* (12mm) et *P.aeruginosa* (10mm) et pour *Helichrysum Bracteiferum* c'est seulement l'extrait hydroalcoolique 75% à chaud qui est performant sur *E.coli* (6mm) ; *S.aureus* (12mm) et *P.aeruginosa* (10mm) sur les autres extraits, les diamètres ne sont pas importants 6mm en moyenne.

En 2017, Sadam dans son travail sur l'huile extraite d'*Helichrysum ibityense* (Asteraceae) sur neuf souches de bactéries et d'une levure montre que les zones d'inhibition variant entre 10 et 34,5mm indiquent que tous les souches sont sensibles à l'huile d'*Helichrysum ibityense* : *Bacillus cereus* 34,5 mm ; *Candida albicans* 20 mm ; *Staphylococcus pneumoniae* 16mm pour *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* sont sensible avec 11,5mm de diamètre. Une activité bactérienne est aussi enregistrée sur la recherche de Randriamiaramisaina en 2010, sur *Cosmos bipinnatus Cav.* (Asteraceae). L'huile de *Cosmos bipinnatus Cav* exerce une plus forte inhibition sur la croissance des bactéries Gram (+) [16 à 18 mm] que sur les bactéries à Gram(-) [12 à 14 mm].

L'extrait aqueux de la plante *Crassocephalum rubens*, utilisé dans la présente étude, semble exercer une activité antibactérienne probante contre les bactéries testées.

Ces activités pourraient être dues aux molécules tels que : les métabolites secondaires contenues dans l'extrait. Il s'agit essentiellement des tanins et des saponines. En effet, d'après la littérature, ces deux familles chimiques ont des activités bactéricides. Elles ont des activités ciblées surtout contre les protéines. En effet, douées de propriétés tensioactives, les saponines font mousser leurs solutions et servent de détergent. Elles présentent une toxicité plus ou moins importante (selon les saponines, les espèces qui les ingèrent et le contexte). Injectées dans le sang ou dans les tissus, elles provoquent la dissolution (lyse) des cellules, des tissus et des globules rouges.

Les tanins ont également de nombreuses activités et des propriétés dont :

- La fixation sur les protéines des membranes biologiques (à l'origine du tannage des peaux, destiné à les rendre imputrescibles)
- L'activité inhibitrice de systèmes enzymatiques, antioxydants, inhibiteurs de la peroxydation lipidique
- En tant qu'anti-inflammatoires mais surtout, antiseptiques, anti-viraux (protecteurs des membranes cellulaires vis-à-vis de la fixation des virus et inhibiteurs de leur réplication), et ayant des activités antibactériennes.

L'avantage des extraits de plantes est surtout le fait qu'il est difficile voire impossible pour les microorganismes de développer des formes de résistance, contrairement aux antibiotiques de synthèse, comme le cas des bêta-lactamases secrétées par les Staphylocoques et par les Pseudomonas.

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les travaux préliminaires réalisés sur la plante *Crassocephalum rubens* nous ont permis :

- ▲ de nous familiariser avec la technique d'extraction aqueuse à chaud d'échantillon de plante et les techniques d'isolement et de caractérisation partielle des souches microbiennes ;
- ▲ de déterminer la présence de métabolites : alcaloïdes, quinones, tanins et composés phénoliques, saponines et triterpènes.
- ▲ de mettre en évidence des activités antibactériennes des extraits aqueux à chaud de *Crassocephalum rubens* plante sur des souches *d'Escherichia coli*, de *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* et de *Staphylococcus aureus* tout en utilisant les antibiotiques de référence. L'extrait semble exercer une action sur les bactéries.

L'activité antibactérienne de l'extrait permet de justifier l'usage thérapeutique de cette plante en médecine traditionnelle.

Cette étude préliminaire a permis d'ouvrir des perspectives de recherche dont notamment :

- ▲ La recherche d'autres molécules présentes au sein de *Crassocephalum rubens*
- ▲ L'étude de l'activité antimicrobienne d'autres types d'extraits (solvants organiques) sur une plus large gamme de microorganismes
- ▲ L'isolement et l'identification des molécules bioactives contenues dans la partie aérienne et racinaire de cette plante à des fins de valorisation en médicaments traditionnels améliorés.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AFNOR., Recueil des normes françaises - Les huiles essentielles, Paris, 4^{ème}Edition, 1996

BOITEAU P., BOITEAU M., BOITEAU L. A. Flore de Madagascar, Index des noms scientifiques avec leurs équivalents malgaches : Edition ALIZIEU, 1997

BOST B., Pharmacopée malgache. Mém. Inst. Scient. Mad, 1961

BOUDJOUREF M., études de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extrait d'*Artemisia campestris L. (ASTERACEAE)*. Université de Ferhat Abbas Setif, 2011

COHEN Y., JACQUOT C. Pharmacologie. 5^{ème}Ed. Masson. Paris. 350p. 2001

DA SILVA J.A.T., Mining the essential oils of the Anthemidea. African Journal of Biotechnology. 3 (12) : 706-720. 2004

ELGHOZI J.L., DUVAL D. Pharmacologie 2^{ème}Ed : Médecine Flammarion. Paris. 289p.1992

FLORKIN M., STOTZ H.E. comprehensive biochemistry metabolism of cyclic compands. Amsterdam, London, New York: Elsevier, 192p.1960

HUMBERT H., Flore de Madagascar et des Comores. Tome II: 189emeFamilles composees. 440-450 ;1963

ISERIN P., Larousse Encyclopédie des plantes médicinales, Edition. Larousse. Iserin, P. 2001.

JEAN-PIERRE N., plantes médicinales du Nord de Madagascar, 2012

LARPENT J-P., LARPENT-GOURGAUD M., Microbiologie pratique, Paris, Hermann, 203p, 1970

LARPENT J-P., LARPENT-GOURGAUD Met al., Mémento technique de Microbiologie, 3èd. Londres, New York, Paris, Lavoisier, 1039p, 1997

LEMMENS R., *Crassocephalum crepidioides* (Benth.) S. Moore. In: Lemmens, R.H.M.J. & Bunyaphatsara, N. (Editors). Plant Resources of South-East Asia No 12(3). Medicinal and poisonous plants 3. Backhuys Publishers, Leiden, Netherlands. pp. 140–14 , 2003

LUCKNER M., secondary metabolism in microorganisms plants and animals. Berlin –New York-Tokyo : Springer Verlag, 2ed.1984

MAURICE N., L'herboristerie d'antan à la phytothérapie moléculaire du XXI^e siècle.Ed. Lavoisier, Paris. p. 12-14 ;1997

NOHARA T., Analysis of steroid and another biological significant steroids. San Diego: Nes. W.D. et Parish E.J. 1989

PATRICK B., JEAN-LOUIS G., MICHEL S. Les bactéries des infections humaines. Bactériologie. Paris : Flammarion Med. Sciences 1^{ère} Ed., 101-126 ; 1988

RAKOTOMALALA H., Etude des huiles essentielles de *Cedrelopsis grevei*: Caractérisation Identification des constituants-Activités biologiques, Thèse de Doctorat Sciences, Université de la Réunion, pp 15-16. 2004

RANDRIAMIARAMISAINA R., contribution aux études chimiques et biologiques de l'huile essentielle de *cosmos bipinnatus cav.* (ASTERACEAE). [Mémoire DEA : biochimie]. Antananarivo : université d'Antananarivo, 2010

RAZANAPANALA R.D., Activités antimicrobiennes d'extrait des feuilles d'*Helychrysium gymnocephalum* et *Helychrysium bractéiferum* (ASTERACEAE), Mémoire de recherche DEA de Biochimie Fondamentale et Appliquée, option « Biotechnologie et Microbiologie », Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo ;2008

SADAM S.M., caractérisation physico-chimique et biologique de l'huile extraite des feuilles de *Helichrysum ibityense*(ASTERACEAE). [Mémoire de Master : biochimie]. Antananarivo : université d'Antananarivo, 2017

SINOT J., Evaluation de l'activité des antibiotiques in vitro. In L Le Minor. Bactériologie médicale. Doin éditeur. 343p,1985

STEVEN L.P., DAVID W.W., microbiology of Waterborne Diseases, 2004

TALLY F.P., Les Staphylocoques : abcès et autres maladies In : SCHAECHTER., MEDOFF,1999

TSIRINIRINDRAVO H. L., Activités bactéricides et insecticides de l'espèce codée THL du genre Ageratum (ASTERACEAE). [Mémoire DEA: biochimie] Antananarivo: Université d'Antananarivo, 63p; 2004

REFERENCES WEBOGRAPHIQUES

Web1 :www.huiles-essentielles.pro/-huiles_essentielles-.html

Web2 : www.aroma-essentiel.fr/.../mandravasarotra-saro-bio-pranarom.html

Web3: www.sngf-madagascar.mg/Harungana_madagascariensis.html

Web4:www.madaenvironnement.org/index.php/madagascar/informations-scientifiques/plantesmedicinales.html

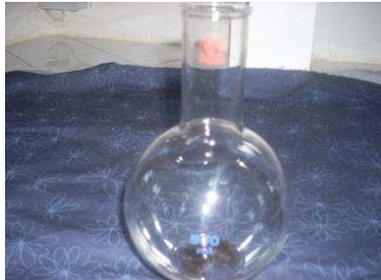
Web5:www.madaenvironnement.org/index.php/madagascar/scientifiques/plantes_medicinales.html

ANNEXES

ANNEXES

Annexe 1 : Matériels de laboratoire et leurs utilisations

1. LES VERRERIES



Ballon à fond plat

Il sert à préparer les milieux de culture ainsi que les suspensions mères.



Eprouvette graduée

Elle permet de mesurer avec précision le volume d'un liquide.



Boîtes de Pétri

Elles sont utilisées pour la culture des microorganismes.



Tubes à essai

Ils sont nécessaires pour la préparation des dilutions ainsi que des cultures microbiennes.



Pipettes graduées

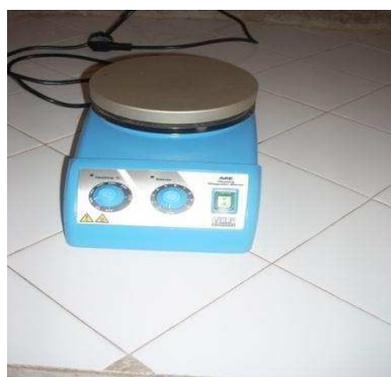
Elles servent à prélever avec exactitude le volume d'un liquide.

2. LES PETITS MATERIELS



Vortex

Il permet d'homogénéiser le contenu d'un tube à essai



Plaque chauffante

Elle est utile pour le chauffage et l'agitation des milieux de culture



Balance de précision

Elle sert à peser les milieux de culture, les réactifs, ainsi que les échantillons de manière précise.



Anse d'ensemencement

Elle est utilisée pour le prélèvement des microorganismes ou de l'inoculum

3. LES GROS MATERIELS



Etuve

Il assure la stérilisation des verreries mais également l'incubation des cultures des microorganismes.



Hotte à flux laminaire

Elle permet d'effectuer les manipulations microbiologiques de manière aseptique



Autoclave

Il sert à stériliser par la chaleur humide des milieux de culture ou de l'eau distillée.

Annexe 2 : Certaines manipulations de l'échantillon

	<p>Mélange de la poudre avec de l'eau distillée</p>
	<p>Homogénéisation</p>
	<p>Extrait brut de <i>Crassocephalum rubens</i></p>
	<p>Préparation de l'antibiogramme</p>

Annexe 3 : Composition des différents milieux de culture

Milieu de Mueller Hunton

Infusion de viande de bœuf déshydraté.....	300g
Hydrolysate acide de caséine	17,5g
Amidon de maïs.....	1,5g
Agar.....	10g
Eau distillée.....	1000 ml

pH=7,4

Milieu Hektoen

Protéase peptone.....	12g
Lactose.....	12g
Salicine.....	2g
Fuschine acide.....	0,08g
Chlorure de sodium.....	5g

Milieu Slanetz

Peptone.....	20g
Glucose.....	2g
Acide de sodium.....	0,4g
TTC triphenyltetrazolium.....	0,1g
Hydrognéophosphate de sodium	4g
Agar.....	10g

pH=7,2

TITLE: Antibacterial activity of the plant extract *Crassocephalum rubens* (ASTERACEAE)

Author : ABDULLAHI Mouhoussini

Framer : Pr ANDRIANARISOA Blandine.

ABSTRACT

The antibacterial activity of the aqueous extract hot of the plant of *Crassocephalum rubens* (ASTERACEAE) was tested on the growth of 4 bacterial strains *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Pseudomonas aeruginosa*. The extract contains molecules phenolic credits alkaloids, quinones, tannins, triterpènes, saponins and compounds with an absence of flavonoïdes and steroids. The method of the discs on solid medium was adopted, with the use of antibiotics. According to our investigations and the data of the literature, this plant is used in traditional medicine for the treatment of the diarrheal diseases. These microbiological tests revealed that the extract inhibits the growth of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Pseudomonas aeruginosa*. The diameters of the halation of inhibition vary from 10 with 16mm.

Keywords: antibiogramme, antibacterial activity, antibiotic, aqueous extract, *Crassocephalum rubens*, ASTERACEAE